

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la infección por *Leishmania infantum* en el perro: utilidad
de las técnicas diagnósticas no invasivas y nuevas alternativas
terapéuticas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Leticia Hernández Martínez

Directoras

Guadalupe Miró Corrales
Ana Montoya Matute

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



Tesis Doctoral

**Estudio de la infección por *Leishmania infantum* en
el perro: utilidad de las técnicas diagnósticas no
invasivas y nuevas alternativas terapéuticas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN VETERINARIA
PRESENTADA POR:

Leticia Hernández Martínez

Bajo la dirección de las Doctoras:

Guadalupe Miró Corrales

Ana Montoya Matute

Madrid 2015



Dña. Guadalupe Miró Corrales, Doctora en Veterinaria y Profesora Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y,

Dña. Ana Montoya Matute, Doctora en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada *“Estudio de la infección por Leishmania infantum en el perro: utilidad de las técnicas diagnósticas no invasivas y nuevas alternativas terapéuticas”* de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Doña Leticia Hernández Martínez, ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

En Madrid, a 7 de Octubre de 2015.

Dra. Guadalupe Miró Corrales

Dra. Ana Montoya Matute

A mis padres

“Donde no falta voluntad siempre hay un camino”

J.R.R. Tolkien

“La búsqueda de la verdad es más preciosa que su posesión”

Albert Einstein

Agradecimientos

Durante estos años han sido muchas las personas que de una manera u otra se han cruzado en mi camino, haciendo posible la realización de esta Tesis Doctoral.

Espero saber transmitir en unas pocas líneas mi agradecimiento a todos los que me han ayudado o acompañado a lo largo de este apasionante camino.

En primer lugar quiero agradecer a mis directoras de Tesis:

A Lupe, por brindarme esta bonita oportunidad y acercarme al maravilloso mundo de la parasitología. Gracias por tus consejos, tus correcciones, por mostrar siempre esa pasión por la investigación y todo lo que haces y por enseñarme que con esfuerzo e insistencia todo es posible. Gracias por haberme hecho partícipe del gran equipo científico y humano que es Epicontrol Carnívoros.

A Ana, por tu ayuda incondicional y estar siempre disponible. No sólo has sido directora de esta Tesis, sino también mi compañera y amiga. Gracias por mostrar tu mejor sonrisa en todo momento e implicarte tanto con todo. Por todos los viajes en coche, tren, avión, bus y tantos muestreos que hemos hecho, que, aunque agotadores a veces, nos han dado tan buenos recuerdos y anécdotas.

Al personal del Departamento de Sanidad Animal, ha sido un placer trabajar con vosotros, y en especial gracias por su ayuda a Reyes, Sonia Olmedo y Cristina Rupérez.

A Rocío, por estar siempre disponible y haber formado parte de esta tesis. Mil gracias por implicarte tanto con las perritas y hacérmelo pasar tan bien en los viajes al norte, a la Vera, etc. Y por supuesto, un gracias muy especial

también a tu tía Pilar, por haber acogido de la mejor manera posible a Boni y hacerla tan feliz.

A Rosa, por haberme echado una mano siempre que lo he necesitado y enseñarme tanto sobre esos pequeños flebotomos, por hacerme ver que las cosas no siempre son tan difíciles como las pintamos.

A Diana, que me ayudaste cuando llegué al laboratorio y por haber cuidado tan bien de las perritas, en especial a Pachona y a Sita.

A Alba, Alejandro, Artemisa, Valentina y resto de becarios con los que he compartido momentos divertidos y han sido partícipes de esta Tesis.

Agradezco la inestimable ayuda de los doctores Juan Torrado y Francisco Bolás, de la Facultad de Farmacia, que han permitido que este trabajo pudiera ser llevado a cabo, y muy especialmente a Loli, por compartir tu tiempo, tus conocimientos, ha sido un placer trabajar contigo.

A Mar y Carmen, de la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria de la UCM, por todas las citas y libros que me habéis buscado, siempre con eficacia y simpatía.

A Ricardo García Mata, del Centro de Cálculo de la UCM, gracias por tu gran ayuda con el análisis estadístico y tu paciencia resolviendo mis numerosas dudas.

Muchísimas gracias también a Abi, de los Servicios Informáticos de la UCM, por tu simpatía, tu paciencia y solucionar de forma tan rápida y eficiente los problemillas técnicos.

A Jesús Modesto Moya Ortega, gracias por tu inestimable ayuda asegurando el bienestar de las perritas y preocuparte tanto por ellas.

Este trabajo tampoco se hubiera llevado a cabo sin la colaboración del grupo de Parasitología del Departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad de Bari, y muy especialmente tengo que agradecer al Doctor Domenico Otranto, por brindarme una experiencia apasionante y hacerme sentir como en casa, por haber mostrado tanto interés, enseñarme tanto y por las correcciones de las publicaciones. Mil gracias también a Stefania Latrofa y Giada por su paciencia y descubrirme el mundo de las PCRs. Y por supuesto, gracias al resto de gente maravillosa que conocí en mi aventura italiana, con la que compartí tanto en tan poco tiempo y que no olvido: Ricardo Lia, Filipe, Lucy, Alessio, Enza, Alessandra, Viviana y Romina.

Al Israel Cruz, del Instituto de Salud Carlos III, y a Gad Baneth, de la Universidad Hebrew de Israel, por su colaboración en el análisis molecular y sus correcciones.

A todo el personal del albergue de protección animal ALBA, por el cuidado diario y todo el cariño dedicado a los ocho perros increíbles que han formado parte de esta tesis: Chalcha, Mopa, Ariela, Canuté, Pocho, Maruchi, Alma Hippy y Lindilla.

No pueden faltar aquí las otras ocho protagonistas de esta tesis, las más fieles y comprometidas del equipo y a las que cogimos tanto cariño: Boni, Pachona, Hulka, Rubi, Ratita, Ana, Sita y Bety.

A Paco, por tu creatividad, tu paciencia y haber sabido ilustrar tan bien la portada de esta tesis.

A mis “perezosas”, Yosu y Elena, por compartir esta aventura desde que empezamos el Máster y todo lo que nos queda (incluyo a la West).

Agradecimientos

A mis amigas veterinarias (Raquel, Lydia, Aída, Aldara, Bea) con las que descubrí y me enamoré de esta profesión y con las que guardo tan buenos recuerdos de la facultad.

A mis amigas Bárbara, Marta, Lidia, Maria José y Johanna, gracias por estar siempre ahí, por vuestros ánimos y todas las risas y vinillos compartidos. Ya os puedo decir que “Por fin!!!”

A mi familia y especialmente a mis padres, gracias por confiar en mí y convertirme en lo que ahora soy. Esto no habría sido posible sin el apoyo incondicional que habéis mostrado, gracias por el infinito cariño y comprensión.

A David, mi compañero de viaje, gracias por estar siempre a mi lado, por tu cariño, por escucharme, por motivarme cuando más falta me ha hecho y por creer en mí, tú siempre has sabido que este momento llegaría. Esta meta la hemos alcanzado juntos.

ÍNDICE

Tabla de equivalencias	vii
Listado de figuras	xi
Listado de tablas	xiii
Resumen	xv
Summary	xxi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. Etiología	11
2.1.1. El parásito	11
2.1.2. El vector	15
2.1.3. Ciclo biológico de <i>Leishmania infantum</i>	23
2.2. Epidemiología	26
2.2.1. Importancia mundial de la leishmaniosis	26
2.2.2. Distribución geográfica de la leishmaniosis canina en Europa	29
2.2.3. Vías de transmisión en la leishmaniosis canina	36
2.2.4. Reservorios	40
2.2.5. El perro como modelo experimental	43
2.2.6. Factores de riesgo	48
2.3. Inmunopatología	51
2.3.1. Respuesta inmunitaria frente a la infección por <i>L. infantum</i> en el perro	51
2.3.1.1. Respuesta inmunitaria innata	51
2.3.1.2. Respuesta inmunitaria adquirida	54
2.3.1.2.1. Respuesta inmunitaria de base celular	54
2.3.1.2.2. Respuesta inmunitaria de base humoral .	56

2.3.2. Patología de la leishmaniosis canina	58
2.4. Diagnóstico	68
2.4.1. Diagnóstico clínico	69
2.4.1.1. Cuadro clínico	69
2.4.1.2. Alteraciones clinicopatológicas	72
2.4.1.3. Diagnóstico diferencial	73
2.4.2. Diagnóstico parasitológico	74
2.4.2.1. Observación microscópica de <i>L. infantum</i> mediante citología	74
2.4.2.2. Cultivo en medio específico	76
2.4.2.3. Aislamiento en animales de laboratorio	77
2.4.2.4. Xenodiagnóstico	78
2.4.2.5. Histopatología	79
2.4.2.6. Inmunohistoquímica	79
2.4.2.7. Diagnóstico molecular: reacción en cadena de la polimerasa	80
2.4.2.7.1. Tipos de muestras	81
2.4.2.7.2. Tipos de PCR	85
2.4.3. Diagnóstico inmunológico	88
2.4.3.1. Análisis de la respuesta inmunitaria humoral	89
- Técnicas serológicas cuantitativas	90
- Técnicas serológicas cualitativas	95
2.4.3.2. Análisis de la respuesta inmunitaria celular	96
2.5. Control	98
2.5.1. Tratamiento	99
2.5.1.1. Principios activos	99
- Antimoniales pentavalentes	100
- Alquifosfolípidos	104
- Anfotericina B	108

- Alopurinol	111
- Aminosidina	113
- Pentamidina	114
- Quinolonas	115
- Derivados del imidazol	116
2.5.1.2. Capacidad infectante de los perros tratados	117
2.5.1.3. Seguimiento post-tratamiento y pronóstico	119
2.5.1.4. Inmunoterapia	121
2.5.1.4.1. Fármacos inmunosupresores	121
2.5.1.4.2. Fármacos inmunoestimulantes	122
2.5.1.5. Resistencias	126
2.5.2. Prevención	128
2.5.2.1. Lucha antivectorial	129
- Collares	131
- Formulaciones <i>spot-on</i>	133
- Pulverizadores	135
2.5.2.2. Vacunas	136
2.5.2.2.1. Vacunas de primera generación	137
2.5.2.2.2. Vacunas de segunda generación	138
2.5.2.2.3. Vacunas de tercera generación	144
2.5.2.3. La eutanasia en perros como medida de control ..	146
2.5.2.4. Manejo de perros clínicamente sanos en áreas endémicas	147
2.6. Importancia en salud pública	148
2.6.1. Brote de leishmaniosis humana en la Comunidad de Madrid	149
3. OBJETIVOS	153
4. PUBLICACIONES	157

4.1. OBJETIVO 1.	
<i>Course of experimental infection of canine leishmaniosis: Follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques</i>	159
4.2. OBJETIVO 2.	
<i>Unresponsiveness of Experimental Canine Leishmaniosis to a New Amphotericin B Formulation</i>	169
4.3. OBJETIVO 3.	
<i>First study on efficacy and tolerability of a new alkylphosphocholine molecule (oleylphosphocholine—OIPC) in the treatment of canine leishmaniosis due to Leishmania infantum</i>	185
5. DISCUSIÓN	195
5.1. Valoración del diagnóstico parasitológico en un modelo experimental de infección por <i>L. infantum</i>	197
5.1.1. Modelo experimental canino	197
5.1.2. Técnicas moleculares	208
5.1.2.1. Valoración de las muestras invasivas	209
5.1.2.2. Valoración de las muestras no invasivas	212
5.2. Alternativas terapéuticas en la leishmaniosis canina	217
5.2.1. Eficacia terapéutica de la anfotericina B poliagregada	219
5.2.1.1. Valoración de los animales antes del tratamiento	220
5.2.1.2. Eficacia clínica de FPA	220
5.2.1.3. Eficacia parasitológica de FPA	224
5.2.1.4. Tolerancia y seguridad de FPA	226
5.2.2. Nueva alternativa terapéutica: eficacia de la oleilfosfocolina	229

5.2.2.1.	Valoración de los animales antes del tratamiento	230
5.2.2.2.	Eficacia clínica de OIPC	230
5.2.2.3.	Eficacia parasitológica de OIPC	232
5.2.2.4.	Tolerancia y seguridad de OIPC	234
6.	CONCLUSIONES	235
7.	BIBLIOGRAFÍA	239
8.	ANEXOS	291

TABLA DE EQUIVALENCIAS

AmB: Anfotericina B

A/G: Cociente albúmina/globulinas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALT: Alanina aminotransferasa

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Trifosfato de adenosina

BCG: Bacilo de Calmette y Guérin

CD: Células dendríticas

CL: Células de Langerhans

CMH I y II: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y II

CPA: Células presentadoras de antígenos

cPCR: PCR convencional directa

DAT: Test de aglutinación directa

DE: Desviación estándar

DTH: Test de hipersensibilidad retardada

EDTA: Ácido etilén-amino-tetracético y sus sales

ELISA: Ensayo por análisis inmunoenzimático

FeLV: Virus de la leucemia felina

FIV: Virus de la inmunodeficiencia felina

FML: Ligando fucosa-manosa

FNT- α : Factor de necrosis tumoral alfa

FPA: Anfotericina B en estado poliagregado

GTP: Trifosfato de guanosina

HCV: Hospital Clínico Veterinario de la UCM

IC: Inmunocomplejos

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IFN-γ:	Interferón gamma
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleuquina
iNOS:	Óxido nítrico sintetasa
IRC:	Insuficiencia renal crónica
IRIS:	Sociedad Internacional de Interés Renal
ITS1:	Espaciador interno transcrito 1 del ADN ribosómico
i.d.:	intradérmica
i.m.:	intramuscular
i.v.:	intravenosa
kDNA:	ADN del kinetoplasto
LB:	Linfocitos B
LC:	Leishmaniosis cutánea
Lcan:	Leishmaniosis canina
LN:	Linfonódulo/s
LPA:	Estudio de linfoproliferación
LT:	Linfocito/s T
LV:	Leishmaniosis visceral
MDP:	Muramil dipéptido
MO:	Médula ósea
NET 10:	Buffer NaCl, EDTA, Tris HCl
NK:	Células <i>natural killer</i>
NNN:	Novy-Nicolle-McNeal
NO:	Óxido nítrico
NO₂:	Dióxido de nitrógeno
nPCR:	PCR anidada
NTDs:	Enfermedades tropicales desatendidas
OIE:	Organización Mundial de Sanidad Animal
OIPC:	Oleilfosfocolina

PAMP: Patrones moleculares conservados

Pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PMNN: Polimorfonucleares neutrófilos

p.e.: por ejemplo

p.t.: post-tratamiento

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

rRNA: ARN ribosómico

s.c.: subcutánea

Th: Linfocitos T colaboradores

TLR: *Toll-like receptors*

UCM: Universidad Complutense de Madrid

UI: Unidades internacionales

UPC: *Ratio* proteínas/creatinina en orina

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

v.o.: vía oral

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación del género <i>Leishmania</i> , basada en caracteres intrínsecos (isoenzimas) y taxonomía numérica	
Figura 2. Características externas de una hembra de flebotomo alimentada repleta de huevos (vista lateral)	
Figura 3. Trampa de luz colocada en una perrera	
Figura 4 (a y b). Lugares típicos donde se desarrollan y alimentan los flebotomos	
Figura 5. Ciclo biológico de <i>Leishmania infantum</i> y sus diferentes vías de transmisión	
Figura 6. Distribución de la infección por <i>L. infantum</i> en el perro en Europa ..	
Figura 7. Mapa de seroprevalencia de Lcan por provincias en España	
Figura 8. Modelo de distribución de la infección, enfermedad y respuestas inmunológicas en perros expuestos a la infección por <i>Leishmania infantum</i> en áreas endémicas	
Figura 9. Representación de la respuesta inmunitaria regulada por linfocitos T colaboradores y linfocitos T citotóxicos en la Lcan	
Figura 10. Citología de médula ósea en un perro con leishmaniosis clínica.....	
Figura 11. PCR en tiempo real con sonda Taqman	
Figura 12. Curva estándar obtenida con qPCR de <i>L. infantum</i> y sonda Taqman	

Figura 13. Algoritmo de diagnóstico en perros con signos clínicos y/o alteraciones clinicopatológicas compatibles con leishmaniosis

Figura 14. Promastigotes de *L. infantum* detectados mediante inmunofluorescencia indirecta

Figura 15. Evolución de la puntuación clínica a lo largo de un año tras la infección experimental por *L. infantum*

Figura 16. Electroforesis de proteínas séricas que muestra un proteinograma alterado del perro nº 4 (D240 p.i.)

LISTADO DE TABLAS

Tabla I. Clasificación taxonómica de <i>Leishmania infantum</i>	
Tabla II. Clasificación taxonómica de los flebotomos vectores de <i>L. infantum</i> en España, <i>P. perniciosus</i> y <i>P. ariasi</i>	
Tabla III. Especies de <i>Leishmania</i> causantes de leishmaniosis humana	
Tabla IV. Tabla de seroprevalencias en España por provincias	
Tabla V. Modelos experimentales caninos de leishmaniosis	
Tabla VI. Porcentaje de aparición de signos clínicos presentes en perros con leishmaniosis por <i>L. infantum</i>	
Tabla VII. Porcentaje de aparición de alteraciones clinicopatológicas en la Lcan	
Tabla VIII. Estadios clínicos de leishmaniosis canina y tipos de tratamiento y pronóstico para cada estadio	
Tabla IX. Clasificación de los perros incluidos en el estudio mediante el sistema de estadios clínicos de la Lcan de las guías del Grupo de Expertos Europeos en Leishmaniosis canina (LeishVet)	
Tabla X. Porcentajes de reducción en la puntuación clínica a lo largo del tiempo (T1-PT6)	

RESUMEN

La leishmaniosis canina (Lcan) causada por *Leishmania infantum* es una zoonosis de distribución mundial endémica en la cuenca mediterránea. Es transmitida a humanos y animales mediante la picadura de las hembras de flebotomos, siendo el perro tanto un hospedador natural como el principal reservorio. Las manifestaciones clínicas de la infección por *L. infantum* en el perro son muy variables, desde una infección subclínica crónica hasta una enfermedad grave, que puede ser fatal. Debido a su compleja patogénesis y al importante papel que juega la respuesta inmunitaria, tanto el diagnóstico como el tratamiento y prevención de esta enfermedad son un reto desde el punto de vista veterinario y de Salud Pública.

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral ha sido encontrar nuevas alternativas tanto diagnósticas como terapéuticas en la Lcan. En cuanto al diagnóstico se ha evaluado el uso de muestras obtenidas de forma menos invasiva y dolorosa, y mejor aceptadas por los perros y por ende por sus propietarios. Y con respecto al tratamiento, se han evaluado dos nuevas moléculas buscando que sea más económico, eficaz, bien tolerado y de fácil administración.

Para ello se han realizado tres ensayos clínicos: los dos primeros con un modelo experimental canino y el tercero en perros con infección natural por *L. infantum*. Para los dos primeros ensayos se empleó el mismo modelo experimental canino, que consistió en ocho perras de raza Beagle infectadas experimentalmente con *L. infantum*, a razón de 5×10^7 promastigotes/ml por vía intravenosa.

En el primer estudio se llevó a cabo el seguimiento del primer año post-infección y se valoraron mensualmente parámetros clínicos, inmunológicos y

parasitológicos, con el fin principal de determinar la presencia de *L. infantum* y comparar la carga parasitaria en diferentes muestras obtenidas tanto de manera invasiva (sangre y médula ósea) como no invasiva (orina, hisopos de conjuntiva, mucosa oral y vulvar). Mientras que la seroconversión ocurrió entre los 120 y los 180 días post-infección, coincidiendo con la aparición de los primeros signos clínicos, la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) detectó ADN de *Leishmania* en la médula ósea en seis perros el día 90 post-infección, siendo éste además el tejido con mayor carga parasitaria durante todo el estudio. De entre las muestras no invasivas analizadas, los hisopos de mucosa vulvar presentaron la mayor carga parasitaria al final del año post-infección, seguido por los hisopos orales, conjuntivales y la orina, en último lugar; confirmando por tanto, no solo la presencia de ADN de *Leishmania* en la mucosa vulvar, sino también su posible aplicación en el diagnóstico de la Lcan.

El segundo ensayo fue diseñado para evaluar la eficacia clínica y leishmanicida así como la tolerancia de una formulación nueva de anfotericina B en estado poliagregado (FPA) en los ocho perros de raza Beagle del estudio anterior. El protocolo de administración consistió en tres dosis de 5 mg/kg en perfusión intravenosa lenta con un intervalo de dos semanas. Al inicio del tratamiento todos los perros mostraban signos clínicos de Lcan y fueron clasificados dentro de los estadios II y III de LeishVet. Todos los perros incluidos fueron estudiados mensualmente a lo largo de seis meses, realizándose siempre un examen físico completo, una toma de muestras para valorar alteraciones clínicopatológicas, realizar serología cuantitativa de anticuerpos anti-*L. infantum* y diagnóstico parasitológico. Las muestras recogidas fueron sangre, médula ósea y orina en las cuales se cuantificó la carga parasitaria los días 30 y 180 post-tratamiento. Para evaluar la tolerancia y propiedades farmacocinéticas del fármaco se

incluyeron además dos perras de raza Beagle sanas y libres de infección por *L. infantum* (confirmado por resultados negativos de PCR en médula ósea y serología). Ambos perros fueron tratados con una dosis de FPA siguiendo la misma pauta que en los ocho perros infectados experimentalmente.

En el tercer ensayo se valoró la eficacia leishmanicida y tolerancia de un novedoso alquilfosfolípido, la oleilfosfocolina (OIPC), en una cohorte de ocho perros (dos machos y seis hembras) con infección natural por *L. infantum* y clínicamente enfermos (clasificados dentro de los estadios clínicos II y III de LeishVet). El tratamiento consistió en la administración oral de 4 mg/kg de OIPC durante 14 días consecutivos. Se valoró su eficacia clínica, la cinética de anticuerpos (IFI) y se realizó un examen parasitológico (citología y cultivo de médula ósea, PCR anidada (nPCR) y qPCR de sangre y médula ósea) en cuatro visitas, durante un periodo de seguimiento de 90 días (antes del tratamiento y en los días 15, 30 y 90 post-tratamiento).

En los dos últimos ensayos clínicos se evaluó la respuesta al tratamiento mediante el cálculo del porcentaje de reducción de la puntuación clínica (obtenida por categorización de los diferentes signos clínicos), la evolución de los análisis clínicos (hemograma, perfil hepato-renal, proteinograma, urianálisis y ratio proteínas/creatinina en orina), de la serología y de los análisis parasitológicos.

La mitad de los animales con leishmaniosis tratados con FPA experimentaron efectos adversos, ya descritos previamente en perros tras la administración de anfotericina B, como hipotensión, diarrea, pérdida de peso, astenia y dolor abdominal. No obstante, en los dos perros sanos, tras una única aplicación de FPA no se observaron efectos adversos. Tan solo se produjo una mejoría clínica en tres de los ocho perros tratados con FPA, observándose además un empeoramiento de la condición clínica,

especialmente con alteraciones cutáneas en la mitad de los perros al final del estudio. A pesar de la reducción del título de anticuerpos anti-*Leishmania* detectados a los seis meses post-tratamiento, tanto los cultivos como las citologías de médula ósea continuaron siendo positivos. De hecho, la qPCR continuó detectando ADN del parásito en las muestras de sangre, médula ósea y orina al final del estudio. Al igual que en el primer ensayo, la mayor carga parasitaria se detectó en médula ósea, y continuó siendo muy elevada a los seis meses post-tratamiento, lo que pone de manifiesto el bajo efecto leishmanicida de la FPA en este órgano de reserva, y el consiguiente riesgo de recidivas tempranas. No obstante, en sangre se redujo la carga parasitaria tras el tratamiento.

A diferencia de lo descrito tras la terapia con FPA, la respuesta al tratamiento con OIPC fue muy rápida y favorable, como se reflejó en la reducción de la puntuación clínica en todos los animales y la ganancia de peso. Cabe destacar que dos de los ocho perros del estudio alcanzaron una remisión completa de los signos clínicos a los 90 días pos-tratamiento. Fue bien tolerada, de manera que ningún perro tratado presentó efectos adversos graves, observándose tan sólo trastornos digestivos leves y transitorios en tres perros (vómitos y/o diarrea). No se demostró una correlación positiva entre la mejoría clínica y el título de anticuerpos, pero sí se encontró una asociación entre la eficacia clínica y la reducción de la carga parasitaria en médula ósea. La sinergia existente entre la miltefosina, un alquilfosfolípido, y el alopurinol, justifica la realización de futuros estudios con la combinación de OIPC y alopurinol.

A pesar de que ninguno de los tratamientos empleados logró un aclaramiento parasitológico total, la OIPC podría considerarse para futuros estudios de eficacia en el tratamiento de la Lcan, ya que mostró una buena eficacia clínica, efectos adversos leves y conlleva una administración oral fácil

y de bajo coste. Por el contrario, los resultados obtenidos tanto desde el punto de vista clínico como parasitológico, así como la baja tolerancia de la FPA al régimen y dosis empleado, no justifican, por el momento, su aplicación en la terapia de la Lcan.

SUMMARY

Canine leishmaniosis (CanL) caused by the protozoan parasite *Leishmania infantum* is a zoonotic disease, endemic in many world regions including the Mediterranean basin. Disease is transmitted by the bite of the female sand fly and dogs are both its natural host and the major reservoir of infection for humans and other animals. Clinical manifestations of *L. infantum* infection in dogs are variable and range from chronic subclinical infection to severe, sometimes fatal, disease. Its complex pathogenesis make the diagnosis, treatment and prevention of this disease a definite challenge from both a veterinary and public health perspective.

This thesis sought to find new diagnostic and therapeutic options for canine leishmaniosis. Non-invasive sampling techniques designed to reduce pain and thus be more readily accepted by dogs and owners were assessed, as were the efficacy and safety of two new molecules, as more cost-effective, easier to administer therapeutic agents.

Three clinical trials were performed: two in an experimental model of infection in the dog and a final trial in dogs naturally infected with *L. infantum*. For the first two studies, we used the same model consisting of eight female Beagle dogs intravenously infected with 5×10^7 promastigotes of *L. infantum* per mL.

In the first study, dogs were monitored monthly for one year after infection to assess clinical, immunological and parasite variables. We detected the presence of *L. infantum* in the animals and compared parasite loads in samples obtained both invasively (blood and bone marrow), and non-invasively (urine, conjunctival, oral and vulvar swabs). While seroconversion occurred from Days 120 to 180 post-infection, at which time the first clinical signs were observed, qPCR detected *Leishmania* DNA as early

as 90 days post-infection in the bone marrow of six dogs. In fact, this tissue showed the highest parasite load during the study period. Among the non-invasive samples assessed, vulvar swabs showed the greater parasite loads at one year post-infection, followed by oral swabs, conjunctival swabs and urine. These results confirm the presence of *Leishmania* DNA in cells of the vulva and also suggest the possibility of including the use of vulvar swabs in the diagnosis of canine leishmaniosis.

The second study was designed to assess the clinical and leishmanicidal efficacy, along with the safety of a new free polyaggregated amphotericin B (FPA) formulation in the same Beagles one year after their infection. The treatment regimen consisted of three 5 mg/kg doses slowly injected by intravenous infusion at two-week intervals. At treatment onset, all the dogs showed common clinical signs of canine leishmaniosis and were classified as clinical stage II and III (LeishVet). Dogs were assessed monthly during a follow-up period of six months, including a complete physical exam and sample collection to detect clinicopathological abnormalities and anti-*L. infantum* antibodies, conduct quantitative serological and parasitological tests. Parasite loads were quantified in the samples collected (blood, bone marrow and urine) on Days 30 and 180 post-treatment onset. Two healthy dogs testing negative for anti-*Leishmania* antibodies and qPCR on bone marrow were included in the study to examine the safety and pharmacokinetics of FPA. Both control animals were treated with a single dose of FPA following the protocol described above for the experimentally infected dogs.

The aim of the final study was to evaluate the leishmanicidal efficacy and safety of a novel alkylphosphocholine agent, oleyl phosphocholine (OIPC), in a cohort of eight dogs (two male, six female) naturally infected with *L. infantum* and defined as clinically sick (Leishvet stages II and III).

Animals were treated orally with 4 mg/kg OIPC for 14 consecutive days. Clinical efficacy, antibody levels (IFAT) and parasitological status (through bone marrow cytology and culture, blood and bone marrow nested PCR and qPCR) were assessed at four time points during a follow-up period of 90 days (before treatment and at 15, 30 and 90 days post-treatment onset).

In the last two clinical trials, the clinical response to treatment was assessed by monitoring over time percentage reductions in clinical scores (using a categorized scoring system of clinical signs) and laboratory (CBC, renal and hepatic profile, urinalysis and protein/creatinine ratio), serology and parasitological test results.

Twenty four to forty eight hours after FPA administration, half of the dogs showed similar adverse effects to those described in dogs treated with amphotericin B including hypotension, diarrhoea, weight loss, asthenia and abdominal pain. However, no such effects were detected in the healthy control Beagles given a single FPA dose. Clinical improvement was observed only in three out of eight FPA-treated dogs. By the end of the study period, the clinical condition of half the dogs had worsened especially in terms of skin lesions. Anti-*Leishmania* antibody titres had significantly diminished at the end of the study, although according to bone marrow cultures and smears, many of the dogs still tested positive for the parasite six months after treatment. In effect, qPCR on blood, bone marrow and urine samples revealed the presence of parasite DNA in all animals at the end of the study. As observed in the first study, bone marrow showed the greatest parasite burden, even at six months after treatment, indicating the poor leishmanicidal effect of FPA in this reservoir organ, which could lead to future relapse. In contrast, a leishmanicidal effect of FPA was detected in blood after treatment.

The other therapeutic agent assessed, OIPC, induced rapid and satisfactory clinical recovery in terms of clinical score reduction and weight gain. Of note, two out of eight dogs showed the complete absence of clinical signs at 90 days post-treatment onset. OIPC was well tolerated and no severe adverse events were noted in any of the treated dogs. Three dogs showed mild, transient digestive disorders (vomiting and/or diarrhoea). Although no correlation between antibody titre and clinical improvement was found, clinical efficacy was related to a reduced bone marrow parasite load. The synergy described between the alkylphospholipid miltefosine and allopurinol justifies future studies to assess OIPC plus allopurinol treatment.

Although neither treatment induced parasitological cure, the use of OIPC as a new treatment option against canine leishmaniosis warrants further investigation given its clinical efficacy, mild side effects, oral administration route and affordable price. Based on the poor treatment outcomes observed for FPA, we would not recommend this drug for the elective treatment of canine leishmaniosis, at least at the dosing regimen tested here.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La Lcan es una importante enfermedad zoonótica, tanto desde el punto de vista veterinario, como de salud pública. Esta enfermedad parasitaria está causada por protozoos del género *Leishmania*, cosmopolitas, que son transmitidos a los humanos y animales por insectos hematófagos, los flebotomos. La Lcan es endémica en más de 80 países en todo el mundo, estando presente en regiones del sur de Europa, África, Asia, Sudamérica y Centroamérica. Hoy en día, se acepta que *L. infantum*, el agente etiológico de la leishmaniosis visceral zoonótica en el Viejo Mundo, y *L. chagasi*, su homólogo en el Nuevo Mundo, son una misma especie. En la cuenca mediterránea *L. infantum* es responsable de la Lcan, donde el perro (*Canis familiaris*) es el principal reservorio para los humanos y otros animales. En el sur de Europa la seroprevalencia media en perros domésticos es del 25%.

Menos de 50 de las cerca de 1.000 especies de flebotomos son vectores competentes de *Leishmania* en el mundo. Las hembras del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, y del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, son los vectores competentes de *Leishmania* inoculando los promastigotes metacíclicos en la piel del hospedador. Los flebotomos son los únicos vectores demostrados de *Leishmania*, siendo necesarios para el desarrollo biológico de los amastigotes a promastigotes metacíclicos, que son la fase infectante. Además, algunos componentes de su saliva juegan un papel fundamental para que la infección se establezca con éxito.

Existen otros modos de transmisión no vectoriales, aunque son menos habituales, como la transfusión de sangre procedente de donantes infectados y la transmisión vertical y venérea.

La seroprevalencia de *L. infantum* en la población canina en España oscila entre el 3,7 y el 34,6%, observándose las mayores seroprevalencias en

el sur y este de España (costa Mediterránea), así como en la provincia de Orense.

La Lcan es una enfermedad sistémica que puede afectar potencialmente a cualquier órgano, tejido o fluido biológico y presenta gran variedad de signos clínicos inespecíficos y niveles de gravedad, debido a la respuesta inmune individual del hospedador. En los perros, el periodo de incubación varía entre los 3 meses y varios años. La mayoría de los perros infectados con *Leishmania* no desarrollan signos clínicos ni alteraciones clínicopatológicas y se estima que en regiones endémicas aproximadamente el 90% infectados de los perros son capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria adecuada y no desarrollan enfermedad a corto plazo, durante años o incluso a lo largo de su vida.

Los signos clínicos observados con más frecuencia incluyen lesiones cutáneas, linfadenomegalia generalizada, pérdida de peso, atrofia muscular, apatía, esplenomegalia, poliuria y polidipsia, lesiones oculares, epístaxis, onicogriposis. Otros menos frecuentes incluyen alteraciones digestivas, neurológicas y cardiorrespiratorias.

Se han utilizado numerosos modelos animales con el fin de estudiar la inmunopatología de la leishmaniosis visceral en humanos, así como para ensayos clínicos preliminares de nuevas moléculas terapéuticas y desarrollo de vacunas. Entre ellos destacan los ratones, cricetos, perros y primates.

El diagnóstico de la Lcan es complicado, debido al amplio abanico de signos clínicos y de respuestas inmunitarias frente a la infección por *L. infantum*, así como a la baja sensibilidad de la detección del parásito por las técnicas diagnósticas convencionales. Por ello, es necesario el uso combinado de los datos clínicos y epidemiológicos, así como la aplicación de

varias pruebas diagnósticas específicas (moleculares y/o serológicas) con el fin de diferenciar la infección por *Leishmania* de la enfermedad.

Se han utilizado numerosas muestras biológicas para detectar ADN de *Leishmania* mediante PCR, con diferentes grados de sensibilidad, como las muestras biológicas “clásicas” (sangre, médula ósea (MO), linfonódulo (LN), bazo y piel), y más recientemente muestras no invasivas (orina, hisopos conjuntivales, etc). No obstante, no existe aún un acuerdo sobre cuál debería ser la muestra de elección. La información proporcionada por la PCR no debe separarse de los datos clínicos, clinicopatológicos y las evaluaciones serológicas.

El control de la leishmaniosis tiene como fin reducir la prevalencia de la enfermedad en el perro y en el ser humano. Las estrategias actuales se basan en un diagnóstico precoz, la lucha contra el vector, el desarrollo de nuevos fármacos leishmanicidas y vacunas.

A pesar de que diversos fármacos y pautas de dosificación se han utilizado con eficacia variable, los principios activos empleados en el tratamiento de la Lcan prácticamente son los mismos desde hace varias décadas. La mayoría consiguen mejorar el cuadro clínico tras el tratamiento y, en algunos casos, incluso inducen una remisión permanente de los signos clínicos, aunque no consiguen una curación parasitológica, siendo, por tanto, las recidivas frecuentes. Además, en muchos casos, conllevan asociada toxicidad. La finalidad del tratamiento de los perros con Lcan no es sólo incrementar su esperanza de vida y mejorar su calidad de vida, sino también disminuir la carga parasitaria, reduciendo de esta manera su poder infectante para los flebotomos.

El fármaco leishmanicida más ampliamente utilizado en el tratamiento de la Lcan es el antimonio de n-metilglucamina, frente al cual están comenzando a aparecer resistencias. Su combinación con alopurinol, agente leishmanioestático, continúa siendo la combinación terapéutica más eficaz y se utiliza como primera línea terapéutica en numerosos países. El segundo principio activo leishmanicida de elección es la miltefosina, principalmente en perros con insuficiencia renal, y también más eficaz en combinación con el alopurinol. Otras drogas empleadas incluyen la anfotericina B, aminosidina, pentamidina, metronidazol, ketoconazol y fluoroquinolonas; sin embargo, los resultados observados de toxicidad de algunos y falta de eficacia de otros, hace que se consideren de segunda línea o que incluso no se recomienden para el tratamiento de rutina de la Lcan. Más recientemente, se ha demostrado que la administración de la domperidona en perros podría ser útil como inmunomodulador en el tratamiento de la Lcan, así como en la prevención de la infección en perros sanos y seronegativos. Otro tratamiento inmunoestimulante es la autovacuna, que presenta una buena tolerancia en el perro, pero que requiere de más estudios, ya que apenas existe material publicado al respecto.

Por último, hay que destacar que el uso reiterado de los fármacos actuales en el tratamiento de la Lcan, puede llegar a crear resistencias, lo que conlleva una gran preocupación, especialmente en cuanto al control de esta zoonosis de importancia global.

Por todo ello, existe una gran necesidad de encontrar principios activos eficaces frente a la Lcan, más fácil de administrar por parte de los propietarios, con menos efectos adversos y que evite la aparición de recidivas y resistencias.

El futuro de la terapia de esta enfermedad de carácter inmunomediado consiste en la aplicación conjunta de agentes leishmanicidas y leishmanioestáticos asociado a inmunomoduladores, con el fin de combatir el parásito y promover una respuesta inmunitaria adecuada.

El uso de sustancias repelentes en el perro se ha convertido en la herramienta más importante para prevenir la infección por *L. infantum*. Los piretroides sintéticos son los productos más activos disponibles en la actualidad y se encuentran en diferentes presentaciones, como collares, pipetas *spot-on* y pulverizaciones. La vacunación se considera hoy en día una de las herramientas más prometedoras para el control de la Lcan. Aunque el principal objetivo de cualquier vacuna debería ser la estimulación de la inmunidad protectora de los linfocitos T, las vacunas disponibles hasta la fecha son eficaces en la prevención de la enfermedad clínica en lugar de evitar la infección por *L. infantum* en sí misma. En los últimos años se han registrado tres vacunas de segunda generación para la Lcan, dos de ellas en Brasil y una en Europa, con diferentes tasas de eficacia en la disminución de la incidencia de la enfermedad según los estudios publicados.

La prevención y el control de la Lcan deben centrarse en reducir el riesgo de infección a nivel individual, y a nivel poblacional en reducir la prevalencia e incidencia de la infección. Esto supone un gran desafío debido a sus complejos mecanismos de transmisión, siendo una de las estrategias más eficaces la combinación de vacunas de nueva generación y repelentes, lo que reduciría el riesgo de transmisión al ser humano.

2. *REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ETIOLOGÍA

2.1.1. El parásito

William Leishman y Charles Donovan identificaron por primera vez en 1903, de forma independiente pero simultánea, este parásito protista en el bazo de enfermos hindúes con signos clínicos semejantes a los producidos por la malaria (Awasthi *et al.*, 2004). Este nuevo agente se denominó *Leishmania donovani*, en honor a sus co-descubridores y a la enfermedad Kala-azar (del sánscrito: Kala “negra, impura” y azar “fiebre”) o leishmaniosis visceral (LV).

Dentro del Reino Protista, el género *Leishmania* se encuentra incluido en la Clase Zoomastigophorea, correspondiente a los protozoos flagelados que carecen de actividad fotosintética. Su clasificación taxonómica se describe en la **Tabla I**.

Tabla I. Clasificación taxonómica de *Leishmania infantum* (Cavalier-Smith, 1998).

Reino	Protista
Filo	Euglenozoa
Subfilo	Saccostoma
Clase	Kinetoplastea
Orden	Trypanosomatida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Leishmania</i>
Especie	<i>L. infantum</i>

Dentro del género *Leishmania* se describen dos subgéneros en función del lugar de reproducción en el tracto digestivo del vector (Lainson y Shaw, 1987): subgénero *Leishmania*, con multiplicación del intestino medio de los flagelados y presente tanto en el Viejo Mundo como en el Nuevo Mundo, y subgénero *Viannia*, con multiplicación en el intestino distal y restringida al Nuevo Mundo. En la **Figura 1** se muestra un esquema con la taxonomía actualizada del género *Leishmania*.

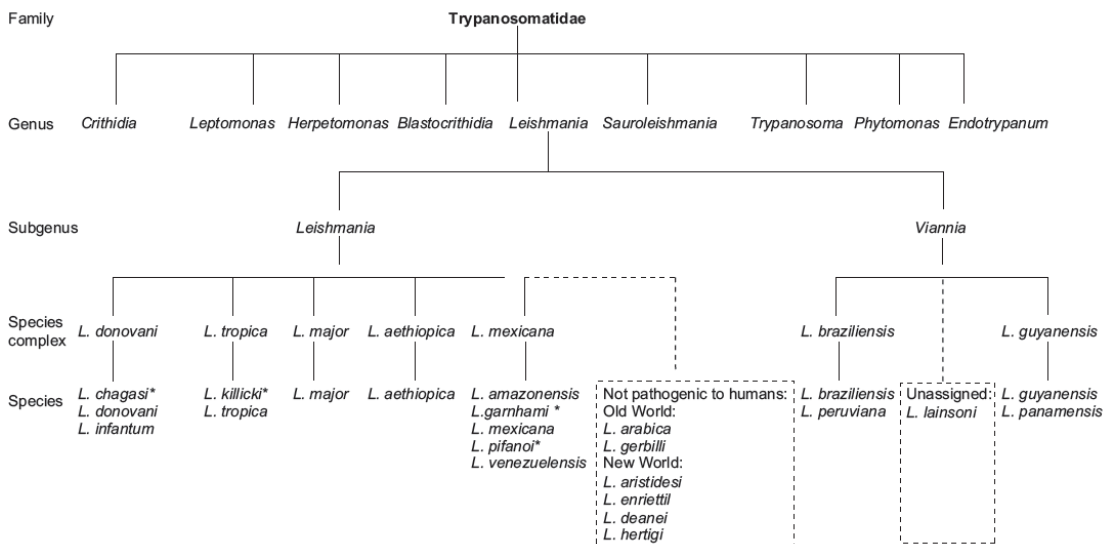


Figura 1. Clasificación del género *Leishmania*, basada en caracteres intrínsecos (isoenzimas) y taxonomía numérica (WHO, 2010). *Especies sometidas a reclasificación. *L. chagasi* en el Nuevo Mundo es sinónimo de *L. infantum* en el Viejo Mundo.

La clasificación de las distintas especies del género *Leishmania* siempre ha sido muy compleja debido a que son morfológicamente indistinguibles. Se han empleado criterios circunstanciales como la geografía, la persona que la describe por primera vez, el cuadro clínico y otras características que han dado lugar a nomenclaturas confusas de las 23 especies conocidas (Killick-Kendrick, 1990). Sin embargo, es esencial identificar y caracterizar las especies para poder conocer la patogenia y epidemiología y establecer el mejor diagnóstico, tratamiento y control. Los

métodos de identificación empleados en la actualidad se basan en el estudio del fenotipo, como isoenzimas y anticuerpos monoclonales, y del genotipo, como el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), la hibridación con sondas de ácidos nucleicos y las técnicas de amplificación de ADN, que estudian directamente el genoma, siendo por tanto más sensibles y específicas.

La clasificación fenotípica basada en la electroforesis de isoenzimas del parásito se considera la técnica de identificación de referencia para la clasificación del género y la identificación a nivel específico e infraespecífico, desde un punto de vista taxonómico. Así, los parásitos de la misma especie que poseen idéntico patrón enzimático pertenecen al mismo zimodema (Hide *et al.*, 2001), denominándose con el acrónimo “MON”. Su mayor limitación técnica reside en la necesidad de aislar parásitos en cultivo y el reducido número de centros que actualmente realizan la caracterización fenotípica (WHO, 2010).

L. infantum incluye 31 zimodemas, siendo el zimodema MON-1 el responsable de la mayoría de las infecciones en el perro (Gállego *et al.*, 2001), considerado su principal reservorio, y del 90% de los casos de LV en humanos (WHO, 2010). La infección por *Leishmania infantum* se describió por primera vez en 1908 por Nicolle y Comte en Túnez, permitiendo expandir a partir de entonces el conocimiento de la Lcan (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Además, es el agente etiológico de la LV zoonótica y la leishmaniosis cutánea (LC), es la única especie de *Leishmania* spp. presente tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo, y es la principal especie implantada en Europa (WHO, 2010). *L. infantum* se incluye dentro del complejo o grupo taxonómico *L. donovani*. *L. donovani sensu stricto* es el agente etiológico del Kala-azar en humanos en el subcontinente indio y el este de África y posee un ciclo de transmisión antroponótico, siendo los humanos el principal reservorio

(WHO, 2010). En el perro se ha confirmado la infección por *L. donovani* en áreas endémicas (Nawaratna *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009; Alam *et al.*, 2013). Se ha detectado la coinfección de *L. donovani* y *L. infantum* en un perro en Chipre, de forma que el movimiento de estos perros al resto de Europa donde se encuentran vectores de *L. donovani*, implica un riesgo de transmisión (Antonίου *et al.*, 2008). No existe una distinción genética clara entre estas dos especies, lo que dificulta su identificación molecular en países donde coexisten ambas, como ocurre en la región oriental del Mediterráneo (El Baidouri *et al.*, 2013).

L. tropica es responsable de causar una forma cutánea de LC en humanos conocida como “botón de Oriente” o “botón de Alepo” y posee un ciclo de transmisión antroponótico, infectando los humanos a los flebotomos. En Europa está presente en las Islas Jónicas de Grecia y en Creta (WHO, 2010). Se han descrito casos esporádicos de LC en perros infectados por *L. tropica* (Mohebbi *et al.*, 2005; Ntais *et al.*, 2013; Baneth *et al.*, 2014), lo que conlleva un riesgo de transmisión a otras partes de Europa donde su vector (*P. sergenti*) está presente (Ready, 2010; Gaglio *et al.*, 2014).

L. major, causante de LC desde África occidental hasta Oriente Medio e India, posee un ciclo de transmisión zoonótico, siendo su principal reservorio los roedores (WHO, 2010). Sin embargo, también se ha aislado en perros en regiones endémicas (Pratlong *et al.*, 2009). Recientemente se ha documentado por primera vez la infección por *L. major* y *L. tropica* en gatos de una región endémica de Turquía (Pasa *et al.*, 2015).

En Brasil, la forma cutánea en el perro causada por *L. braziliensis* es una enfermedad común diagnosticada en perros que viven en zonas rurales, donde la LC en los humanos también es endémica, habiéndose documentado

casos de coinfecciones por *L. infantum* y *L. braziliensis* en perros (Madeira *et al.*, 2006; Dantas-Torres *et al.*, 2010).

2.1.2. El vector

Los flebotomos (Diptera: Psychodidae) son vectores de varios agentes infecciosos y parasitarios como *Phlebovirus*, *Vesiculovirus*, *Bartonella bacilliformis* y *Leishmania* spp. Las hembras son los únicos insectos capaces de transmitir las especies del género *Leishmania* conocidas (Killick-Kendrick, 1990).

Taxonomía y distribución geográfica

Se han identificado 98 especies de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* como vectores confirmados o sospechosos de leishmaniosis canina y humana (Maroli *et al.*, 2013). La **Tabla II** recoge su posición taxonómica.

En Europa existen nueve especies de flebotomos autóctonos *P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus*, *P. tobbi*, *P. kandelaki*, *P. balcanicus*, *P. papatasi* y *P. sergenti*, consideradas vectores demostrados o potenciales de *L. infantum* (Antoniou *et al.*, 2013). Además, otras especies de estatus taxonómico cuestionable (*P. similis*, *P. syriacus*) o con posible capacidad vectorial pero no demostrada (*P. mascitti*) deberían ser estudiadas.

En España hay dos especies involucradas en la transmisión de la enfermedad, *P. ariasi* y *P. perniciosus*, siendo esta última la más prevalente, debido a su abundancia y dispersión por la mayor parte de la geografía española (Martín-Sánchez *et al.*, 1994; Gálvez *et al.*, 2010a). *P. perniciosus* predomina en las zonas áridas o semiáridas de la Península Ibérica y *P. ariasi*

queda restringido a regiones húmedas y templadas y a cotas elevadas (Aransay *et al.*, 2004; Gálvez *et al.*, 2010a).

Tabla II. Clasificación taxonómica de los flebotomos vectores de *L. infantum* en España, *P. perniciosus* y *P. ariasi* (Killick-Kendrick, 1999).

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Subfilo	Mandibulata
Clase	Insecta
Orden	Diptera
Suborden	Nematocera
Familia	Psychodidae
Subfamilia	Phlebotominae
Género	<i>Phlebotomus</i>
Especie	<i>P. perniciosus</i> <i>P. ariasi</i>

Existe un marcado estenoxenismo entre la especie del vector flebotomo y la especie de *Leishmania* que transmite basada en actividades enzimáticas específicas y ligandos presentes en el intestino del insecto que permiten únicamente a las especies específicas de *Leishmania* adherirse a su pared y replicarse sin ser excretadas del intestino con la sangre digerida (Volf *et al.*, 2008). Infecciones experimentales han demostrado que tan sólo dos especies de flebotomos, *P. papatasi* y *P. sergenti*, son “vectores específicos”, es decir, únicamente permiten la maduración de una sola especie de *Leishmania*, la cual transmiten en la naturaleza (*L. major* y *L. tropica*, respectivamente), y son incapaces de que otras especies de *Leishmania* se desarrollen en su interior (Pimenta *et al.*, 1994; Kamhawi *et al.*, 2000; Jecna

et al., 2013). Sin embargo, la mayoría de las especies de flebotomos analizadas hasta el momento permiten que múltiples especies de *Leishmania* maduren en su intestino medio, denominándose por tanto “vectores permisivos” (Volf y Myskova, 2007). Esta amplia competencia vectorial es muy importante desde el punto de vista epidemiológico y debe tenerse en cuenta a la hora de estimar el riesgo de aparición de nuevos focos de leishmaniosis y la transmisión en zonas no endémicas. Un ejemplo es la introducción en América Latina de *L. infantum* procedente de la Península Ibérica hace 500 años, donde se adaptó a su vector local permisivo *Lutzomya longipalpis* (Lukes *et al.*, 2007; Volf y Myskova, 2007). *L. Longipalpis* es un vector “muy permisivo”, puesto que puede ser infectado con diversas especies como *L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, y también podría estar implicado en la transmisión de *L. amanzonensis* (Tolezano *et al.*, 2007; Savani *et al.*, 2009).

En Australia, un mosquito ceratopogónido diurno del género *Forcipomyia*, subgénero *Lasiohelea* se ha descrito como vector de una especie de *Leishmania* endémica en Australia (Dougall *et al.*, 2011). Dicho mosquito podría ser el vector responsable de la infección presente en una población de canguros rojos en cautividad y otras especies de mamíferos salvajes pertenecientes a la familia *Macropodidae* (Rose *et al.*, 2004; Dougall *et al.*, 2009).

La alimentación de los flebotomos, tanto machos como hembras, se basa en recursos naturales azucarados, procedentes de plantas e insectos que son su aporte energético. Tan sólo las hembras son hematófagas, obteniendo de la sangre las proteínas plasmáticas necesarias para desarrollar los huevos (Killick-Kendrick, 1999). Tras la ingesta de sangre, las hembras buscan microhábitat húmedos donde reposar unos días antes de localizar un lugar donde realizar la puesta (Miró y Molina, 2006). El periodo comprendido

entre una ingesta de sangre y la siguiente (ciclo gonotrófico) nunca es inferior a seis días, y la mayoría de los flebotomos son concordantes gonotróficos, es decir, efectúan una oviposición por ingesta de sangre.

Las especies vectores de *L. infantum* en nuestro entorno son antropozoófilas, con una mayor preferencia por el ganado y por los perros que por los humanos (Miró y Molina, 2006). Estos insectos poseen fototropismo positivo (Killick-Kendrick, 1999; Sharma y Singh, 2008), lo que permite capturarlos fácilmente mediante trampas de luz. *P. perniciosus* es endofílico, entra en las habitaciones, pica, reposa un corto periodo de tiempo en ellas y regresa a sus refugios naturales.

Los flebotomos están ampliamente influenciados por factores abióticos, existiendo una correlación positiva entre la densidad de insectos y la temperatura y una correlación negativa con la humedad relativa, hecho que determina su dinámica estacional (Tarallo *et al.*, 2010; Dantas-Torres *et al.*, 2014; Gaglio *et al.*, 2014). Su rango de actividad se encuentra entre los 15 y 28°C, siendo favorable la ausencia de viento o lluvia (Killick-Kendrick, 1999). En nuestras latitudes son las larvas de cuarto estadio las que entran en letargo, coincidiendo con el comienzo de las estaciones más frías. La supervivencia del parásito durante el invierno se mantiene principalmente en perros infectados, ya que no se ha demostrado la transmisión transovárica de *Leishmania* en el vector (Bates, 2007).

Mientras que la temperatura se considera un factor limitante para el establecimiento de grandes poblaciones de flebotomos en países de zonas frías (Maroli *et al.*, 2013), la altitud no lo es tanto (Maroli *et al.*, 1990; Dantas-Torres *et al.*, 2014) y algunas especies, como *P. mascittii*, pueden establecerse en latitudes altas (Poepl *et al.*, 2013).

Los flebotomos son insectos holometábolos, con una fase de huevo, cuatro estadios larvarios terrestres con sus correspondientes mudas, una pupa sésil y una fase adulta. El ciclo completo, desde la ingesta de sangre del flebotomo hasta la aparición de los primeros adultos, transcurre en unas seis semanas (Munstermann, 2005). En regiones de clima templado se han descrito la presencia de al menos dos ciclos biológicos completos por temporada (Gaglio *et al.*, 2014). Las hembras grávidas son atraídas a lugares con sustratos húmedos para realizar la oviposición, ya que los huevos son muy sensibles a la desecación (Munstermann, 2005). Ésta se realiza en lugares arenosos, en penumbra, con humedad relativa alta, temperatura constante y con abundante materia orgánica que servirá de alimento para las futuras larvas (Sharma y Singh, 2008). Cada puesta consta de un promedio de 20-50 huevos, de aspecto fusiforme, con ambos extremos redondeados y una superficie ornamentada con crestas y entrantes que configuran patrones taxonómicos de gran valor (Munstermann, 2005).

Las larvas son lucífugas y soportan mejor la desecación que los huevos, debido a la presencia de una gruesa cutícula esclerotizada y se alimentan de desechos orgánicos (Sharma y Singh, 2008). El hábitat terrestre de las larvas hace que se hayan identificado una gran variedad de biotopos como madrigueras, grietas de muros, establos, corrales, jardines, sótanos, zanjas, alcantarillas, hendiduras del terreno, ruinas, minas y vertederos (Miró y Molina, 2006).

La pupa es sésil, y se fija verticalmente por su extremo abdominal a la superficie del sustrato mediante los restos del tegumento del último estadio larvario (Munstermann, 2005). Son más resistentes a la desecación que las larvas.

El flebotomo adulto posee una serie de rasgos morfológicos característicos, como ser de pequeño tamaño (2-3 mm), color amarillento, una densa pilosidad que recubre todo su cuerpo de aspecto giboso, incluso patas, alas y antenas. Poseen unas patas largas y alas de aspecto lanceolado, que se insertan en el cuerpo con un ángulo de 45-60° con respecto al eje longitudinal (Munstermann, 2005; Miró y Molina, 2006) (**Fig. 2**). Tienen una probóscide corta y un aparato bucal picador-chupador con las piezas bucales completas sólo en las hembras.



Figura 2. Características externas de una hembra de flebotomo alimentada repleta de huevos (vista lateral).

El aparato genital de los machos (externo e interno) y de las hembras (interno) tiene una gran importancia taxonómica. Las hembras tienen un abdomen cilíndrico y grueso que contiene los conductos genitales internos y las espermatecas, con grandes variaciones en el tamaño y en la forma entre especies y subespecies. Los machos tienen un aparato genital externo con simetría bilateral y una potente armadura genital que le permite anclarse a la hembra durante la fecundación (Sharma y Singh, 2008). Realizan un vuelo silencioso, desplazándose a modo de pequeños saltos y no suelen recorrer distancias superiores a los 200-400 metros, no obstante, se han

documentado distancias máximas de 2200 metros (Killick-Kendrick *et al.*, 1984; Munstermann, 2005). La escasa movilidad de estos vectores explica la existencia de zonas de alta prevalencia rodeadas de otras con un número muy inferior de casos, determinando la aparición de focos endémicos aislados (Ashford, 2000).

La actividad de los flebotomos adultos es crepuscular, comienza con la puesta del sol, prolongándose durante las primeras horas de la noche, desde el principio de la primavera hasta el final del otoño en la cuenca mediterránea (Mayo-Octubre) y durante todo el año en Sudamérica (Killick-Kendrick, 1999; Lucientes *et al.*, 2005; Sharma y Singh, 2008). Las dos especies vectores de *L. infantum* en la Península Ibérica (*P. perniciosus* y *P. ariasi*), son activas principalmente en los meses de mayo a octubre (Miró y Molina, 2006; Aránguez *et al.*, 2014), excepto en el sur, donde su actividad se extiende de marzo a diciembre (Martínez-Ortega, 1986). En otras zonas hiperendémicas, como en el sur de Italia, los periodos de actividad de los flebotomos coinciden con los de la Península Ibérica, recogándose la mayor parte de *P. perniciosus* en Julio y Agosto, los meses con mayor temperatura media y humedad relativa baja (Otranto *et al.*, 2013).

La estimación de la abundancia relativa de flebotomos en un área no es fácil, ya que las fases inmaduras (larvas y pupas) son difíciles de encontrar y, por tanto, los métodos de recolección normalmente detectan los adultos, (Sangiorgi *et al.*, 2012; Casanova *et al.*, 2013; Vivero *et al.*, 2015).

El número de *P. perniciosus* capturados 50 cm por encima del suelo es 3,6 veces mayor que a 150 cm, lo que sugiere que esta especie posee un patrón de vuelo bajo. La altura a la que se colocan las trampas de luz (**Fig. 3**) debe tenerse en cuenta, ya que normalmente se sitúan a unos 100-150 cm del suelo, lo que conlleva amplias variaciones en el número y especies de flebotomos capturados (Gaglio *et al.*, 2014).



Figura 3. Trampa de luz colocada en una perrera.

En cuanto a la influencia de la fase lunar sobre la actividad de los flebotomos, se han capturado mayor número de *P. perniciosus* y *S. minuta* en Italia, y de *L. longipalpis* en Colombia, durante las noches de luna llena (Morrison *et al.*, 1995; Gaglio *et al.*, 2014). En cambio, en Kenia no se han observado diferencias en las capturas de *Phlebotomus* spp. y *Sergentomyia* spp. en las distintas fases lunares. Debe tenerse en cuenta que la luminosidad excesiva puede perjudicar la eficiencia de las trampas de luz, por lo que deben situarse en lugares apropiados (Gaglio *et al.*, 2014).

Los flebotomos se distribuyen tanto en zonas urbanas (Tarallo *et al.*, 2010; Gaglio *et al.*, 2014) como rurales (Dantas-Torres *et al.*, 2014), y aunque se asocian a ambientes naturales, como cuevas y bosques, algunas especies, como *P. papatasi* y *P. sergenti*, se han adaptado a los ambientes modificados por los humanos, donde encuentran áreas de descanso y de cría y fuentes de alimentación, lo que incrementa el riesgo de transmisión de la infección por *Leishmania* a las personas y animales domésticos (Dantas-Torres *et al.*, 2014). De hecho se ha encontrado una mayor densidad de especies de flebotomos vectores de *L. infantum* (*P. perfiliewi*, *P. perniciosus* y *P. neglectus*) en ambientes peridomésticos que en zonas boscosas, donde la presencia de fauna salvaje es intermitente. En cambio, las poblaciones rurales proporcionan un hábitat apropiado y fuentes de alimentación permanentes para las fases inmaduras y adultas (garajes de casas, establos, etc.) (Dantas-Torres *et al.*, 2014) (Figs. 4a y 4b).



Figuras 4a y 4b. Lugares típicos donde se desarrollan y alimentan los flebotomos.

2.1.3. Ciclo biológico de *Leishmania infantum*

El ciclo biológico de *Leishmania* es asexual y heteroxeno, es decir, tiene lugar en dos hospedadores diferentes, uno intermedio que actúa como vector, y un hospedador definitivo (Fig.5). Se trata de un ciclo de vida digenético, con una forma de promastigote móvil y flagelada, localizada en el

tubo digestivo del hospedador invertebrado (Killick-Kendrick, 1990) y una forma inmóvil y aflagelar o amastigote, que afecta al hospedador vertebrado, localizándose principalmente en los macrófagos.

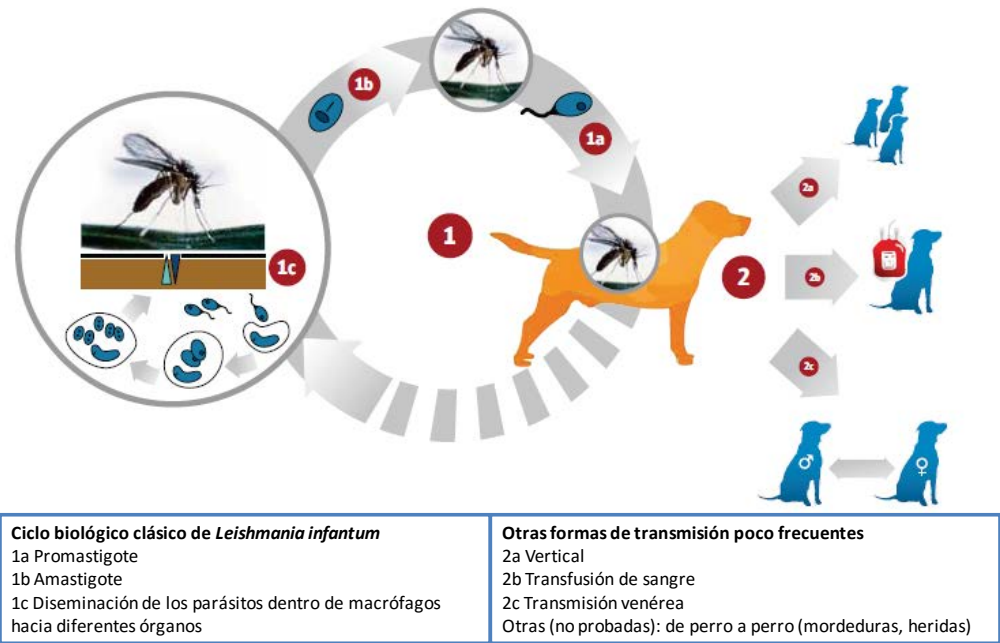


Figure 1 The life cycle of *L. infantum* with indication of proven and unproven non-sandfly routes of transmission to dogs.

Figura 5. Ciclo biológico de *Leishmania infantum* y sus diferentes vías de transmisión.

Fuente: Solano-Gallego *et al.*, 2011.

Cuando la hembra de flebotomo infectada regurgita sangre en un hospedador vertebrado inoculara junto con su saliva los promastigotes metacíclicos presentes en su proboscis. Una vez en los capilares cutáneos del punto de inoculación del vertebrado, los parásitos son fagocitados por los macrófagos, quedando incluidos en una vacuola parasitófora con el fin de eliminarlos mediante la síntesis y liberación de diversas moléculas, destacando el papel leishmanicida del óxido nítrico (NO) (Holzmüller *et al.*, 2006). En ella los parásitos evaden las reacciones inmunológicas inespecíficas del macrófago y 12-24 horas tras la inoculación se transforman en amastigotes, (Sharma y Singh, 2008), los cuales se multiplican por sucesivas fisiones binarias (Antoine *et al.*, 1990). Tras la multiplicación dentro de los macrófagos infectados, estos se lisan y permitirán la liberación del parásito

en forma de amastigotes, pudiendo ser fagocitados por macrófagos o neutrófilos próximos y favorecer, por tanto, la diseminación del parásito y alcanzar diversos órganos del sistema linfohematopoyético, como MO, LN, bazo e hígado, entre otros.

La progresión de la enfermedad dependerá de la virulencia del parásito, de la dosis infectante inoculada por el vector y de condiciones del hospedador infectado (eficacia de la respuesta inmune, condiciones socioeconómicas y predisposición genética) (Alvar *et al.*, 2004; Reithinger *et al.*, 2007). Las células parasitadas circulantes pueden ser ingurgitadas por otros flebotomos, en cuyo aparato digestivo los amastigotes se liberan de las células en las que se encontraban alojados, y desarrollan un flagelo para transformarse en promastigotes procíclicos, tras 24-48 horas. Estos se multiplican por fisión binaria longitudinal, alcanzando tras varios días la capacidad infectante (promastigotes metacíclicos), proceso denominado metaciclogénesis. En este momento, los parásitos se encuentran en la probóscide de la hembra de flebotomo infectante, pudiendo ser inoculados a un nuevo hospedador vertebrado, cerrándose así el ciclo biológico del parásito (Molyneux, 1987).

Para asegurar la transmisión, el parásito ha desarrollado una serie de mecanismos capaces de alterar el comportamiento del vector (Rogers y Bates, 2007), de manera que el vector infectado con promastigotes metacíclicos (fase infectante) ingiere sangre un mayor número de veces y durante más tiempo, optimizando así la transmisión.

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

2.2.1. Importancia mundial de la leishmaniosis

La leishmaniosis engloba a un grupo de enfermedades causadas por más de 20 especies y subespecies de protozoos flagelados pertenecientes al género *Leishmania*, que afectan tanto al ser humano como a otros vertebrados. Es una zoonosis de importancia mundial en salud pública y actualmente constituye la tercera enfermedad humana más importante de las transmitidas por vectores, tras la malaria y la filariasis, y la novena enfermedad infecciosa más grave a nivel mundial (Alvar *et al.*, 2006).

De entre las 15 especies de *Leishmania* con reservorios conocidos que afectan a los humanos, 13 son zoonóticas (WHO, 2010).

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010) la leishmaniosis es endémica en 98 países, la mayoría de ellos en vías de desarrollo, y se estima que 350 millones de personas están en riesgo de contraerla. La incidencia mundial anual se calcula en 2 millones de casos, de los cuales 500.000 corresponden a LV y 1,5 millones a LC, aumentando la incidencia en áreas urbanas y periurbanas de los trópicos (Dye, 1996). Se estima que la LV causa unas 50.000 muertes anuales (WHO, 2010); no obstante, la información epidemiológica sobre esta enfermedad es limitada ya que muchos de los casos no son notificados. Más del 90% de los casos de LV se concentran en seis países: India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía y Brasil (Alvar *et al.*, 2012).

En humanos la leishmaniosis presenta diferentes formas clínicas, que se resumen en la **Tabla III**.

Tabla III. Especies de *Leishmania* causantes de leishmaniosis humana.

<i>Leishmania</i> spp. del Viejo Mundo	Manifestaciones clínicas	Ciclo de transmisión	Distribución geográfica principal	Principal reservorio
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	LV, LC	Zoonótico	Cuenca mediterránea, Oriente Medio, Asia, norte y oeste de África.	Perro
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	LV, LC, LDPK	Antroponótico	África, Asia central y sudeste de Asia.	Humanos
<i>L. (Leishmania) major</i>	LC, LM	Zoonótico	Norte y Este de África, Asia central, Oriente medio	Roedores
<i>L. (Leishmania) tropica</i>	LC, LM	Antroponótico	Asia Central, sudeste de Asia, Oriente Medio, Norte de África	Desconocido
<i>L. (Leishmania) killicki</i> ¹	LC	Zoonótico	Algeria, Libya, Túnez	Desconocido
<i>L. (Leishmania) aethiopica</i>	LC, LCD, LM	Zoonótico	Etiopía, Kenia	Roedores
<i>Leishmania</i> spp del Nuevo Mundo				
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	LV,LC	Zoonótico	América del Sur y Central	Perro
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	LC, LCD	Zoonótico	Brasil, cuenca del Amazonas	Roedores
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	LC, LMC	Zoonótico	América Central, Texas	Roedores
<i>L. (Leishmania) pifanoi</i> ¹	LC, LCD	Zoonótico	Venezuela	Desconocido
<i>L. (Leishmania) venezuelensis</i>	LC, LCD	Zoonótico	Venezuela	Desconocido
<i>L. (Leishmania) garnhami</i>	LC	Zoonótico	Costa Rica, Venezuela	Desconocido
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LC, LMC	Zoonótico	América del Sur y Central	Perro
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	LC, LMC	Zoonótico	América del Sur y Central	Perezoso
<i>L. (Viannia) guayanensis</i>	LC, LMC	Zoonótico	América del Sur	Perezoso
<i>L. (Viannia) lainsoni</i>	LC	Zoonótico	América del Sur	Roedores
<i>L. (Viannia) colombiensis</i> ²	LC	Zoonótico	Colombia, Panamá, Venezuela	Desconocido
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	LC, LMC	Zoonótico	Perú	Perro
<i>L. (Viannia) shawi</i>	LC	Zoonótico	Brasil	Mamíferos arborícolas
<i>L. (Viannia) naiffi</i>	LC	Zoonótico	Brasil, Guayana francesa	Armadillo
<i>L. (Viannia) lindenbergi</i>	LC	Zoonótico	Brasil	Desconocido

¹, clasificación de la especie en discusión; ², clasificación taxonómica en discusión; LV, Leishmaniosis Visceral; LC, Leishmaniosis cutánea; LDPK, Leishmaniosis Dérmica post-Kala Azar; LM, Leishmaniosis de las Mucosas; LCD, Leishmaniosis Cutánea

Difusa. Información extraída de: Gramiccia y Gradoni, 2005; Chappuis *et al.*, 2007; Reithinger *et al.*, 2007; WHO, 2010; Cantacessi *et al.*, 2015.

La leishmaniosis se enmarca dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas (NTDs: neglected tropical diseases), debido a su asociación con la pobreza y a la escasez de recursos disponibles para su control, diagnóstico y tratamiento. Factores como la malnutrición, la mala condición de las viviendas, la falta de higiene, la inmunodepresión, la coinfección con VIH y la falta de atención sanitaria predisponen a padecer esta enfermedad en países en vías de desarrollo. Además, la industria farmacéutica no ha logrado desarrollar nuevos fármacos eficaces incrementando la dificultad en el control de esta enfermedad (Desjeux, 2004; Dujardin *et al.*, 2008).

La LV antroponótica (*L. donovani* y *L. tropica*), en la cual el ser humano actúa como reservorio de la enfermedad, es de especial importancia, ya que causa epidemias frecuentes y mortales, fundamentalmente en regiones del Sudeste Asiático y en el este de África (p.e. Sudán) (Desjeux, 2004; Alvar *et al.*, 2012). Brasil posee la mayor tasa de incidencia de LV zoonótica (*L. chagasi*) del mundo, con alrededor de 3000 casos anuales (Andrade *et al.*, 2011).

En Europa la leishmaniosis, causada por *L. infantum*, es una zoonosis emergente, apareciendo 700 nuevos casos anuales (Hotez y Gurwith, 2011). En la cuenca mediterránea están presentes cuatro especies: *L. infantum*, la más frecuente, causante de LV y LC; *L. major*, presente en el Norte de África y Oriente Medio, causante de LC; *L. tropica*, en Grecia, Turquía, Oriente Próximo y el Norte de África, origina LC; y *L. donovani*, hallada recientemente en Chipre, origina tanto LV como LC (Alvar *et al.*, 2004; Antoniou *et al.*, 2013). Estas especies son capaces de propagarse a nuevas áreas geográficas donde encuentren vectores flebotomos adecuados en número suficiente y

bajo condiciones ecológicas favorables (Ready, 2010). El riesgo de propagación es mayor cuando están implicadas especies antroponóticas, (*L. tropica* y *L. donovani*) ya que el ser humano, necesario para completar el ciclo biológico, es el hospedador que actúa como reservorio (Antoniou *et al.*, 2013).

En Europa la leishmaniosis, causada por *L. infantum*, es una zoonosis emergente, apareciendo 700 nuevos casos anuales (Hotez y Gurwith, 2011). En la cuenca mediterránea están presentes cuatro especies: *L. infantum*, la más frecuente, causante de LV y LC; *L. major*, presente en el Norte de África y Oriente Medio, causante de LC; *L. tropica*, en Grecia, Turquía, Oriente Próximo y el Norte de África, origina LC; y *L. donovani*, hallada recientemente en Chipre, origina tanto LV como LC (Alvar *et al.*, 2004; Antoniou *et al.*, 2013). Estas especies son capaces de propagarse a nuevas áreas geográficas donde encuentren vectores flebotomos adecuados en número suficiente y bajo condiciones ecológicas favorables (Ready, 2010). El riesgo de propagación es mayor cuando están implicadas especies antroponóticas, (*L. tropica* y *L. donovani*) ya que el ser humano, necesario para completar el ciclo biológico, es el hospedador que actúa como reservorio (Antoniou *et al.*, 2013).

2.2.2. Distribución geográfica de la leishmaniosis canina en Europa

La infección por *L. infantum* en perros es endémica en más de 70 países del mundo (Solano-Gallego *et al.*, 2011), pero se desconoce la prevalencia global en perros domésticos (Gradoni, 2015). Las 947 encuestas llevadas a cabo tan sólo en el sur de Europa, incluyendo 500.000 perros, muestran una seroprevalencia media del 10% (Franco *et al.*, 2011), alcanzando el 30% en base a Italia, Francia, España y Portugal, donde al

menos 2,5 millones (de 15 millones) de perros están infectados (Moreno y Alvar, 2002).

La Lcan es endémica en todos los países de la cuenca mediterránea, incluyendo Portugal, España, Francia, Italia, Grecia, Croacia, Albania, Malta, Chipre y Turquía (**Fig. 6**) (Dujardin *et al.*, 2008; Schallig *et al.*, 2013). Cambios socioeconómicos y climáticos están facilitando su expansión a nuevas localizaciones en Europa, principalmente hacia el norte, ya sea por la contigüidad territorial, a menudo asociada al calentamiento global que favorece la transmisión vectorial, o bien por la importación de perros infectados (Maia y Cardoso, 2015). En estos países la Lcan es una enfermedad vectorial emergente (Dantas-Torres *et al.*, 2012; Ready *et al.*, 2014). En los últimos años, se han descrito unos 700 casos importados de Lcan en países de Europa considerados tradicionalmente no endémicos, al norte de regiones con Lcan (Antonίου *et al.*, 2013). En ausencia de medidas profilácticas, la introducción de perros infectados en áreas previamente libres de Lcan y con un vector competente puede resultar en el establecimiento persistente de *L. infantum* (Maia y Cardoso, 2015).

Esta especie en los últimos años ya ha alcanzando los Alpes en el norte de Italia (Maroli *et al.*, 2008), los Pirineos en Francia (Chamailié *et al.*, 2010) y el norte de España (Miró *et al.*, 2012). Además, se han descrito casos clínicos importados en países no endémicos, como Reino Unido (Shaw *et al.*, 2009), Alemania (Naucke *et al.*, 2008; Menn *et al.*, 2010), Austria (Leschnik *et al.*, 2008), Bulgaria (Harizanov *et al.*, 2013) y Serbia (Savić *et al.*, 2014), considerándose casos autóctonos de Lcan los recientemente descritos en Alemania (Mencke, 2011), Hungría (Tánczos *et al.*, 2012) y Finlandia (Karkamo *et al.*, 2014).

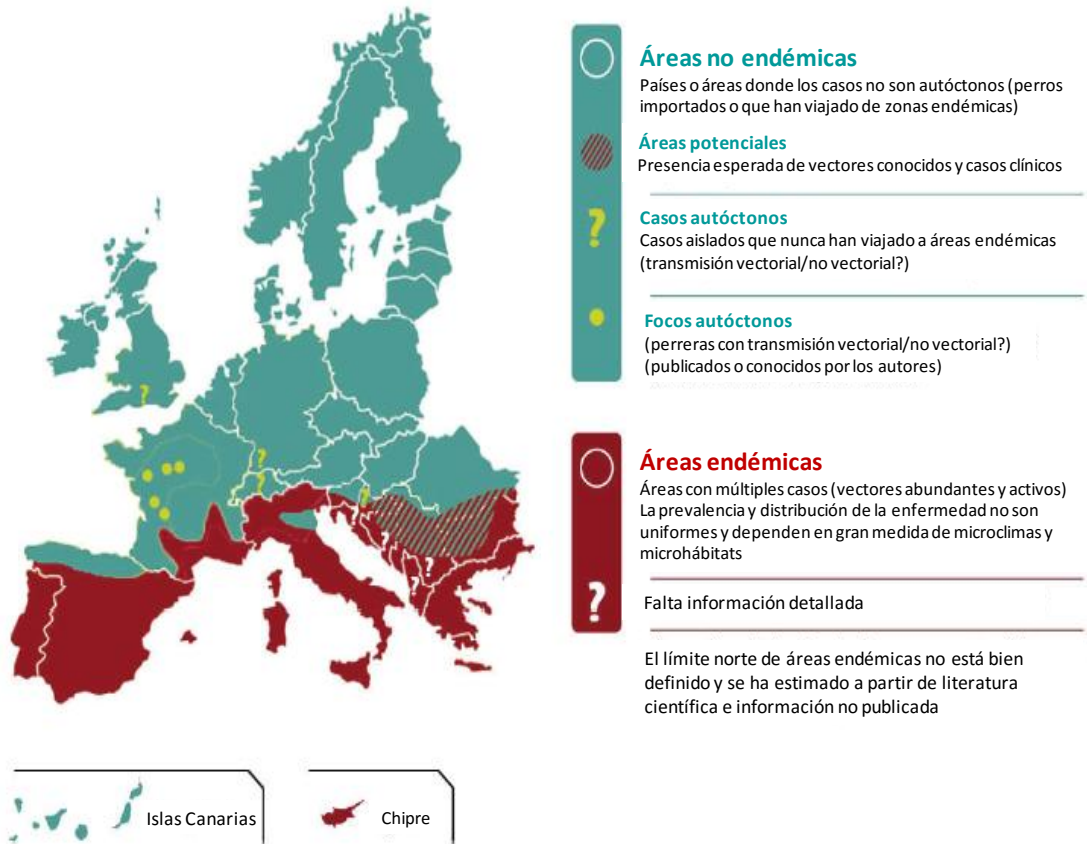


Figura 6. Distribución de la infección por *L. infantum* en el perro en Europa. Fuente: Solano-Gallego *et al.*, 2011.

En la cuenca mediterránea, la enfermedad se distribuye en focos endémicos con una prevalencia de infección muy variable entre focos hipoendémicos e hiperendémicos (Pennisi, 2015).

Desde mediados de los años 80, diversos estudios epidemiológicos en la población canina en España muestran un amplio rango de seroprevalencias, desde 0% en Asturias y Vizcaya (Miró *et al.*, 2012; Miró *et al.*, 2013) hasta 65% en Barcelona (Solano-Gallego *et al.*, 2006) lo que pone de manifiesto su distribución parcheada (**Fig. 7**). Las diferencias halladas entre las diferentes comunidades autónomas pueden deberse al tamaño de la muestra y las técnicas serológicas empleadas. Los casos detectados en las

islas Canarias procedían de la Península o habían viajado a zonas endémicas (Pou-Barreto *et al.*, 2013).

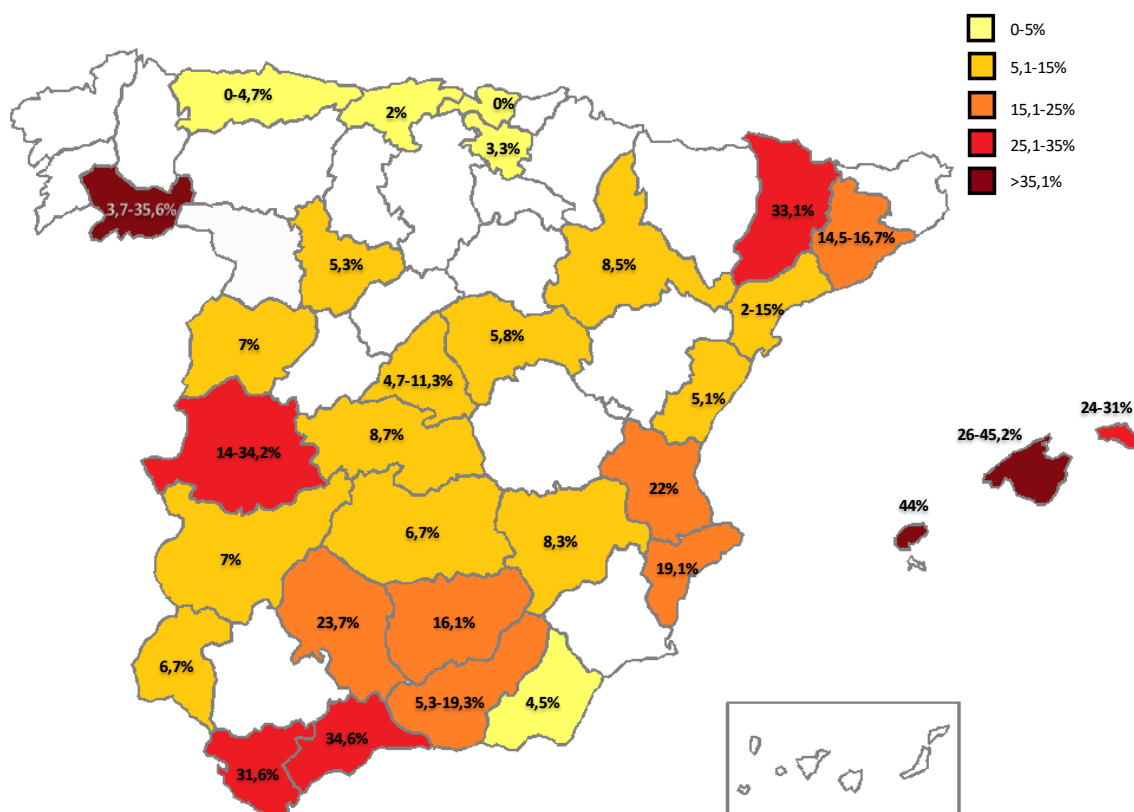


Figura 7. Mapa de seroprevalencia de Lcan por provincias en España.

Tabla IV. Tabla de seroprevalencias en España por provincias.

PROVINCIA	TÉCNICA	SEROPREVALENCIA (%)	RANGO DE SEROPREVALENCIAS (%)	REFERENCIA
Álava	IFI	3,3	3,3	(Sáez de Santamaría <i>et al.</i> , 1997)
Albacete	IFI-ELISA	8,3	8,3	(Benito y Alvar, 1989)
Alicante	ELISA	22	22	(Alonso <i>et al.</i> , 2010)
Almería	IFI	4,5	4,5	(Sanchís-Marín <i>et al.</i> , 1997)
Asturias	IFI	4,7	0-4,7	(Miró <i>et al.</i> , 2012)
	Test rápido	0		(Miró <i>et al.</i> , 2013)
Badajoz	ELISA	7	7	(Rosado <i>et al.</i> , 1997)
Barcelona	IFI	14,5	14,5-16,7	(Botet <i>et al.</i> , 1987)
	IFI	16,7		(Corachán <i>et al.</i> , 1987)
Bizcaia	IFI	0	0	(Miró <i>et al.</i> , 2012)
Cádiz	IFI	31,6	31,6	(Morales-Yuste <i>et al.</i> , 2011)
Cáceres	IFI	15	14-34,2	(Encinas Grandes <i>et al.</i> , 1988a)
	IFI	14		(Nieto <i>et al.</i> , 1992)
	ELISA	34,2		(Rosado <i>et al.</i> , 1995)
Cantabria	IFI	2	2	(Miró <i>et al.</i> , 2012)
Castellón	IFI	5,1	5,1	(Arnedo <i>et al.</i> , 1994)
Ciudad Real	IFI	6,7	6,7	(Benito y Alvar, 1989)
Córdoba	IFI, ELISA	23,7	23,7	(Martínez-Cruz <i>et al.</i> , 1990)
Granada	IFI	19,3	5,3-19,3	(Reyes <i>et al.</i> , 1989)
	IFI	5,3		(Acedo Sánchez <i>et al.</i> , 1996)
	IFI	16,1		(Acedo-Sánchez <i>et al.</i> , 1998)
	IFI	13		(Martín-Sánchez <i>et al.</i> , 2009)
Guadalajara	IFI, ELISA	5,8	5,8	(Benito y Alvar, 1989)
Ibiza	IFI, ELISA, test rápido	44	44	(Alcover <i>et al.</i> , 2013)
Huelva	IFI	6,7	6,7	(Lepe <i>et al.</i> , 2000)
Jaén	IFI	16	16	(Corachán <i>et al.</i> , 1987)
Madrid	IFI	5,2	4,7-11,3	(Amela <i>et al.</i> , 1995)
	IFI	4,7		(Castañeda <i>et al.</i> , 1999)
	IFI	11,3		(Castañeda <i>et al.</i> , 2000)
	IFI	8,6		(García-Nieto <i>et al.</i> , 2002)
	IFI	7,8		(Miró <i>et al.</i> , 2007)
	IFI	8,1		(Gálvez <i>et al.</i> , 2010)
Málaga	IFI	34,6	34,6	(Morillas <i>et al.</i> , 1996)
Mallorca	ELISA	26	26-38,3	(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2001a)
	ELISA	29,3		(Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2006)
	IFI, ELISA	35,2-38,35		(Pujol <i>et al.</i> , 2007)
	Western Blot	37,5		(Cabezón <i>et al.</i> , 2010)
Menorca	IFI, ELISA, test rápido Western Blot	24-31	24-31	(Alcover <i>et al.</i> , 2013)

Cont. Tabla IV. Tabla de seroprevalencias en España por provincias.

PROVINCIA	TÉCNICA	SEROPREVALENCIA (%)	RANGO DE SEROPREVALENCIAS (%)	REFERENCIA
Orense	IFI	3,7	3,7-35,6	(Amusatogui <i>et al.</i> , 2004)
	IFI	35,6		(Miró <i>et al.</i> , 2012)
Salamanca	IFI	7	7	(Encinas Grandes <i>et al.</i> , 1988b)
Tarragona	IFI	15	2-15	(Fisa <i>et al.</i> , 1991)
	IFI, ELISA	10,2		(Fisa <i>et al.</i> , 1999)
	IFI	2		(Portús <i>et al.</i> , 1987)
Toledo	IFI	8,7	8,7	(Benito y Alvar, 1989)
Valladolid	Test rápido	5,3	5,3	(Couto <i>et al.</i> , 2010)
Zaragoza	IFI	8,5	8,5	(Castillo <i>et al.</i> , 1985)

Los estudios de prevalencia llevados a cabo en otros países arrojan valores de 5-40,3% en Brasil (Dantas-Torres *et al.*, 2006; Michalsky *et al.*, 2007; Coura-Vital *et al.*, 2014); 33,6% en Colombia por PCR (Paternina Gómez *et al.*, 2013); 15,4% en Irán (Mahshid *et al.*, 2014); 1,9% por DAT y 1% por PCR en Angola (Vilhena *et al.*, 2014); y 26,7% en Túnez (Zoghalmi *et al.*, 2014). Australia es un país considerado libre de leishmaniosis, sin embargo se han descrito casos de enfermedad en personas con historia de viajes a zonas endémicas, así como en perros importados a Australia de países endémicos (Cleare *et al.*, 2014). La importación de perros europeos infectados también se ha descrito en Japón (Kawamura *et al.*, 2010), la Guayana francesa (Rotureau *et al.*, 2006) y Angola (Vilhena *et al.*, 2014).

La prevalencia de la infección por técnicas moleculares es significativamente más alta que la seroprevalencia, como se ha demostrado en perros seronegativos por PCR (Fernández-Bellon *et al.*, 2008). A su vez, mediante la detección de la inmunidad celular específica se han detectado prevalencias de hasta el 65% (Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2000). En un estudio realizado en la isla de Mallorca en el que el 13% de los perros presentaban leishmaniosis clínica evidente, el 26% eran seropositivos, frente al 63% que resultó positivo mediante PCR (de piel, conjuntiva y/o MO)

(Solano-Gallego *et al.*, 2001a). En otro estudio realizado en Grecia en 73 perros, el 12,3% resultaron positivos mediante serología, mientras que el 63% resultaron positivos mediante PCR de MO (Leontides *et al.*, 2002). No obstante, en el estudio llevado a cabo por Otranto *et al.* (2010c), la serología detectó más perros infectados por *L. infantum* que la PCR de piel o MO.

En cuanto a la incidencia, se calcula que aproximadamente entre el 3-10% de los perros se infectan en cada periodo de transmisión en las áreas rurales y semirurales (Paradies *et al.*, 2006).

A pesar de las prevalencias elevadas registradas por las distintas técnicas, el 90-95% de los perros infectados por *L. infantum* no desarrollan signos clínicos ni alteraciones clinicopatológicas, siendo la prevalencia de la enfermedad frecuentemente inferior al 10% en regiones endémicas (Solano-Gallego *et al.*, 2009). De esta manera la Lcan solo representa la punta del iceberg en áreas endémicas, donde la mayor parte de la población está expuesta a la infección (Baneth *et al.*, 2008). La **Figura 8** muestra cómo se distribuyen la infección, la enfermedad y las respuestas inmunitarias en un foco endémico.

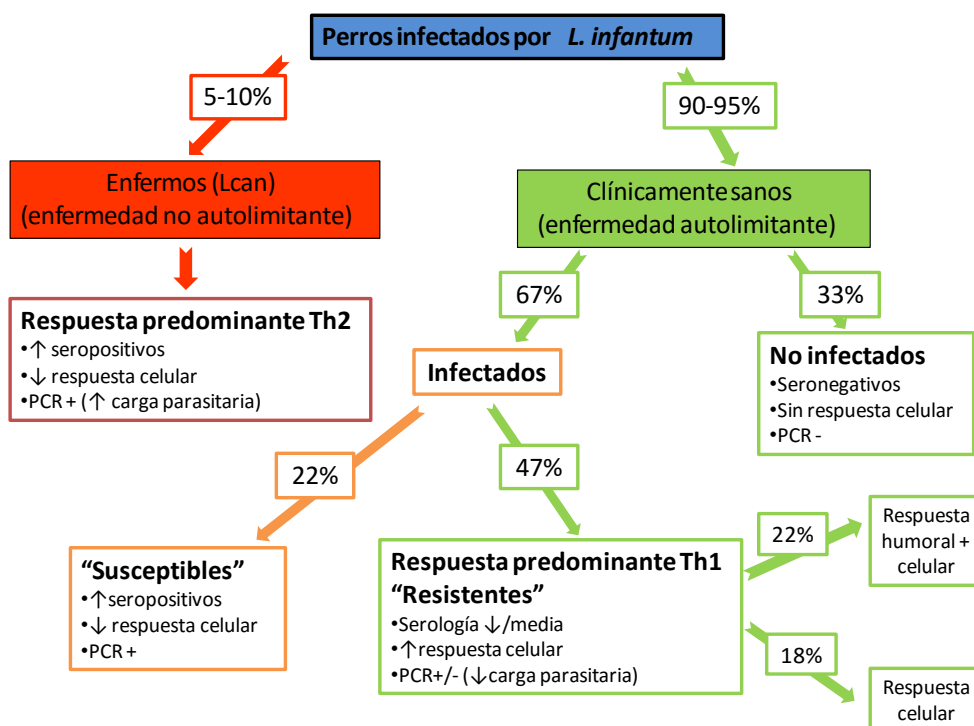


Figura 8. Modelo de distribución de la infección, enfermedad y respuestas inmunológicas en perros expuestos a la infección por *Leishmania infantum* en áreas endémicas. Información extraída de: Solano-Gallego et al., 2009. Los perros infectados considerados "susceptibles" desarrollarán muy probablemente signos clínicos y alteraciones clinicopatológicas propias de la Lcan, al contrario que los perros infectados considerados "resistentes".

2.2.3. Vías de transmisión de la leishmaniosis canina

Salvo la excepción descrita en Australia, los flebotomos son los únicos artrópodos adaptados para la transmisión biológica de la infección por *Leishmania* spp. Una proporción relativamente baja (0,5-3%) de flebotomos portadores de *L. infantum* es suficiente para mantener la infección en áreas endémicas (Gómez-Saladín et al., 2005; Martín-Sánchez et al., 2006). La transmisión es estacional y está condicionada tanto por la densidad de las poblaciones del vector como por la dinámica demográfica de los hospedadores vertebrados, de manera que cuando coinciden una elevada densidad de vectores y de hospedadores caninos en el tiempo, la infección se propaga rápida y ampliamente entre la población canina (Quinnell et al.,

1997; Oliva *et al.*, 2006). El éxito de la infección por *Leishmania* en el hospedador vertebrado depende del equilibrio establecido entre el flebotomo y el patógeno en el ciclo intravectorial. El parásito se enfrentará en el tubo digestivo del flebotomo a barreras naturales, físicas o químicas.

En regiones endémicas con condiciones medioambientales favorables se ha estimado que un perro puede recibir más de 100 picaduras por hora en una noche, hallándose hasta un máximo de 10,5% (Bettini *et al.*, 1986), y como media 1% de los flebotomos infectados (Gradoni, 2002). Con estos datos se puede estimar que un perro puede recibir aproximadamente una picadura infectante por hora (Gradoni, 2002). En condiciones naturales, un flebotomo pica frecuentemente al hospedador liberando entre 10-500 promastigotes (30 parásitos de media), junto con metabolitos de la digestión en la dermis del hospedador (Maia *et al.*, 2011).

Aunque no existen datos de reinfecciones bajo condiciones naturales, en áreas endémicas son muy probables, ya que los perros están expuestos durante toda la época de actividad de los flebotomos. Experimentalmente se ha observado cierto grado de resistencia a la reinfección en perros infectados expuestos por segunda vez a la infección (Santos-Gomes *et al.*, 2003), sin embargo, es posible que perros resistentes inicialmente terminen sucumbiendo a la infección tras continuos contactos con el parásito, o que perros infectados por un aislado de *Leishmania* se infecten con otro diferente, posiblemente más virulento (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Algunos autores han evaluado la capacidad vectorial de otros artrópodos hematófagos, como ixódidos de la especie *Rhipicephalus sanguineus* (Coutinho *et al.*, 2005), pulgas de la especie *Ctenocephalides felis felis* (Coutinho y Linardi, 2007; Ferreira *et al.*, 2009), y más recientemente la

“mosca del caballo” *Tabanus importunus* (Coelho y Bresciani, 2013), y *Culicoides* spp. (Slama *et al.*, 2014), sin haberse demostrado experimentalmente su papel en la transmisión natural de *Leishmania*.

También se ha propuesto, aunque no se ha demostrado, la posibilidad de una vía de transmisión directa entre perros, a través de mordeduras o heridas, como ya se ha documentado para *Babesia gibsoni* (Yeagley *et al.*, 2009). Este modelo de transmisión podría explicar la existencia de casos autóctonos de Lcan en zonas no endémicas como es el caso de Estados Unidos (Duprey *et al.*, 2006) y Finlandia (Karkamo *et al.*, 2014), en ausencia aparente de vectores competentes.

La transmisión vertical (transplacentaria o lactogénica) se ha demostrado en perros con infección natural por *L. infantum* en regiones endémicas (da Silva *et al.*, 2009; Pangrazio *et al.*, 2009), no endémicas (Rosypal *et al.*, 2005b; Boggiatto *et al.*, 2011; Naucke y Lorentz, 2012) y en una Beagle infectada experimentalmente (Rosypal *et al.*, 2005b). El suministro de sangre de la placenta está en estrecho contacto con la circulación materna, pudiendo pasar los macrófagos infectados a la circulación fetal (Rosypal y Lindsay, 2005). Durante la gestación, la inmunosupresión es necesaria para prevenir reacciones inmunes contra los antígenos fetales. Por tanto, el cambio “fisiológico” de respuesta inmune Th1 a Th2 que se produce durante la gestación puede aumentar la gravedad del cuadro clínico, así como el riesgo de transmisión congénita de Lcan (Rosypal *et al.*, 2005b). En regiones endémicas, se desconoce la frecuencia de transmisión vertical debido a la elevada probabilidad de contacto con el vector (Mancianti *et al.*, 1988). La transmisión vertical también se ha descrito en humanos, incluso a partir de madres asintomáticas (Pagliano *et al.*, 2005; Boehme *et al.*, 2006), y experimentalmente en ratones (Rosypal y Lindsay, 2005).

Otra vía de transmisión de la enfermedad en perros es la venérea (Silva *et al.*, 2009; Naucke y Lorentz, 2012). Riera y Valladares (1996) demostraron la presencia de *Leishmania* spp. en el semen de un perro infectado experimentalmente con *L. infantum* mediante cultivo en medio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle). Los machos enfermos frecuentemente presentan lesiones inflamatorias donde es posible evidenciar la presencia de amastigotes, en el epidídimo, la glándula del pene y el prepucio (Diniz *et al.*, 2005), pudiendo desarrollar orquitis (Manna *et al.*, 2012) y prostatitis crónica (Mir *et al.*, 2012). En cambio, en hembras la única lesión genital externa observada es la dermatitis vulvar (Silva *et al.*, 2008). Silva *et al.* (2009) demostraron la transmisión sexual de *L. chagasi* en perros con infección natural, en cuyo semen se había detectado el parásito, que copularon con 12 hembras sanas libres de *Leishmania*. El 25% de las hembras seroconvirtieron y el 50% fueron positivas mediante PCR. La transmisión sexual en perros tiende a ser unidireccional, siendo más eficiente desde machos infectados a hembras susceptibles (Turchetti *et al.*, 2014).

La transfusión de sangre de animales infectados también es una vía de transmisión a tener en cuenta (Owens *et al.*, 2001), teniendo vital importancia en zonas donde los donantes de sangre podrían ser portadores de la infección (Owens *et al.*, 2001; de Freitas *et al.*, 2006; Tabar *et al.*, 2008).

En humanos, también existe la transmisión mediante fómites, como en el caso del uso compartido de jeringuillas entre la población toxicómana usuaria de drogas parenterales (Cruz *et al.*, 2002; Molina *et al.*, 2003) y trasplante de órganos (Antinori *et al.*, 2008).

En un estudio llevado a cabo en 1437 donantes de sangre de las Islas Baleares (Mallorca, Menorca y Formentera) se detectaron anticuerpos frente a *L. infantum* en 44 personas (3,1%) (Riera *et al.*, 2008). Además, el ADN del

parásito fue amplificado en los neutrófilos polimorfonucleares (PMNN) del 5,9% de 304 donantes seleccionados al azar de Mallorca. Estos resultados ponen de manifiesto la elevada prevalencia de la infección por *Leishmania* en los donantes de sangre de esta región.

2.2.4. Reservorios

El perro (*Canis familiaris*) es el principal reservorio peridoméstico de la infección por *L. infantum*, debido al elevado número de individuos presentes en el nicho ecológico y su estrecha relación con el vector (Alvar *et al.*, 2004).

Los perros frecuentemente entran en contacto con otros cánidos salvajes, como el zorro, el lobo o el chacal, los cuales también se infectan y son infectantes para el vector, manteniendo el ciclo selvático (Gramiccia y Gradoni, 2005). Sin embargo, este ciclo no es considerado como la principal fuente de transmisión de la leishmaniosis a los humanos o perros, ya que el número es menor y hay una baja proporción de animales susceptibles en condiciones salvajes (Gomes *et al.*, 2007; Luppi *et al.*, 2008).

El zorro podría ser el nexo de unión entre el ciclo doméstico y el selvático debido a su preferencia por vivir cerca de poblaciones humanas, pudiendo actuar como reservorio secundario (Fisa *et al.*, 1999; Sobrino *et al.*, 2008). El zorro rojo (*Vulpes vulpes*) está considerada la especie con mayor frecuencia de casos documentados, aunque no se han descrito signos clínicos en esta especie (Criado-Fornelio *et al.*, 2000; Dipineto *et al.*, 2007; Sobrino *et al.*, 2008; Muñoz-Madrid *et al.*, 2013). Criado-Fornelio *et al.* (2000) detectaron mediante PCR una prevalencia de hasta el 74% en Guadalajara, España, y Dipineto *et al.* (2007) del 40% en el sur de Italia.

El cánido silvestre en el que se han descrito más signos clínicos de LV, concretamente glomerulonefritis membrano-proliferativa (Luppi *et al.*, 2008), es el denominado “perro venadero” o “zorro vinagre” (*Speothos venaticus*), procedente de América del Sur (Lima *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2010; Jusi *et al.*, 2011).

Existen diversas especies de mamíferos en las que se ha identificado *Leishmania* incluyendo primates en Brasil (Malta *et al.*, 2010) marsupiales en Australia y España (Rose *et al.*, 2004; Dougall *et al.*, 2009; Miró *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2013), lagomorfos en España (Molina *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2014a), roedores en Portugal y Grecia (Papadogiannakis *et al.*, 2010b; Helhazar *et al.*, 2013), murciélagos en Brasil, Venezuela y Etiopía (De Lima *et al.*, 2008; Savani *et al.*, 2010; Kassahun *et al.*, 2015) y tamandúas en Brasil (De Araújo *et al.*, 2013). También se ha descrito la infección en aves (Alexander *et al.*, 2002; Otranto *et al.*, 2010b).

En áreas endémicas se ha documentado la infección en otros animales domésticos, incluyendo gatos (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2010; Millán *et al.*, 2011), caballos (Solano-Gallego *et al.*, 2003a; Rolão *et al.*, 2005; Fernández-Bellon *et al.*, 2006), cerdos (Moraes-Silva *et al.*, 2006), vacas (Lobsiger *et al.*, 2010), ovejas y cabras (Fisa *et al.*, 1999), que actuarían como hospedadores paraténicos, aunque no se conoce su papel epidemiológico. Los animales mantenidos en cautividad en zoológicos en áreas urbanas endémicas están bajo un riesgo elevado de infección, pudiendo suponer un riesgo para otras especies susceptibles, incluyendo los humanos (Jusi *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2014).

En España se ha denunciado la infección por *L. infantum* en fauna silvestre, como lobos (*Canis lupus*), zorro (*V. vulpes*), lince ibérico (*Lynx pardinus*), gineta (*Geneta geneta*), meloncillo (*Herpestes ichneumon*),

garduña (*Martes foina*), marta (*Martes martes*) erizo europeo (*Erinaceus europaeus*), rata común (*Rattus norvegicus*) y liebre ibérica (*Lepus granatensis*) (Sastre *et al.*, 2008; Sobrino *et al.*, 2008; Millán *et al.*, 2011; 2014; Molina *et al.*, 2012; Muñoz-Madrid *et al.*, 2013).

La creciente descripción de casos de leishmaniosis felina en la literatura hace pensar que los gatos pueden desempeñar un papel en la epidemiología de la leishmaniosis, de forma que en áreas endémicas de Lcan, lejos de ser un reservorio meramente accidental, podría actuar como un reservorio secundario de la enfermedad (Gramiccia y Gradoni, 2005; Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007b). No obstante, las infecciones felinas subclínicas son comunes en áreas endémicas de Lcan, aunque los casos de leishmaniosis clínica en gatos son poco frecuentes (Miró *et al.*, 2014).

Algunas características de su comportamiento, como hábitos nocturnos de caza, distancias recorridas medias de 1,5 km desde sus hogares, y la incursión en zonas forestales, actuando como enlace entre el ambiente doméstico y salvaje, favorecen la diseminación del parásito en esta especie (da Silva *et al.*, 2008).

Diversos estudios han demostrado que vectores competentes de *Leishmania* se alimentan de la sangre de gatos de forma natural y mediante xenodiagnóstico han confirmado que los gatos son capaces de infectar con *L. infantum* a *P. perniciosus* y *L. longipalpis* (Maroli *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2010; Afonso *et al.*, 2012).

La prevalencia de anticuerpos en gatos es muy variable, de 0-68,5% y mediante PCR en sangre de 0-60,6% (Chatzis *et al.*, 2014; Pennisi, 2015). En un estudio reciente llevado a cabo en 346 gatos en Madrid se obtuvo una seroprevalencia de 3,2%, mientras que no fue posible amplificar ADN de

Leishmania en ninguna muestra de sangre de animales seropositivos (Miró *et al.*, 2014). En general, la prevalencia descrita en gatos tanto mediante PCR como por serología es menor que en perros de áreas geográficas similares (Pennisi, 2015).

2.2.5. El perro como modelo experimental canino

Se han utilizado numerosos modelos animales con distintos fines: estudiar la inmunopatología de la LV en humanos, realizar ensayos clínicos preliminares de nuevas moléculas terapéuticas y vacunas aplicables tanto en el perro como en los humanos.

El requisito principal que debe cumplir un modelo de infección experimental es inducir la infección en todos los animales (Fernández-Cotrina *et al.*, 2013).

Se han empleado ratones de diferentes estirpes (Howard *et al.*, 1980; Hommel *et al.*, 1995; Courret *et al.*, 2003), cricetos (Courret *et al.*, 2003; Gomes-Silva *et al.*, 2013), perros (Moreno y Alvar, 2002; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013) e incluso primates (Chapman y Hanson, 1981; Chapman *et al.*, 1983; Dube *et al.*, 1998).

El modelo murino en la infección por *Leishmania* spp. ha sido particularmente útil para entender el papel de la respuesta inmune del hospedador en el establecimiento de la susceptibilidad o resistencia a la infección (Garg y Dube, 2006; Pereira y Alves, 2008; Sharma y Singh, 2009). Sin embargo, el ratón no reproduce la enfermedad observada en los perros o humanos, por lo que representa un modelo mejor de infección subclínica. El criceto, por el contrario, desarrolla una enfermedad progresiva en la que los parásitos se multiplican en diferentes órganos, lo que conduce, en algunos casos, a la muerte. Reproduce la clínica y patogénesis de la enfermedad en

humanos y perros, siendo para algunos autores el mejor modelo experimental tanto de LV humana como canina (de Oliveira *et al.*, 2004).

Los primates son necesarios para testar vacunas y fármacos destinados a los humanos debido a su proximidad filogenética. Entre las especies empleadas se encuentran los monos ardilla, macacos y aotus (Garg y Dube, 2006).

El perro constituye un modelo de estudio de la leishmaniosis excelente, ya que actúa como hospedador natural, reservorio principal y es un buen modelo para estudiar la enfermedad en humanos debido a que presentan gran similitud en las alteraciones clínicopatológicas y respuestas inmunes al parásito (Campino *et al.*, 2000; Leandro *et al.*, 2001; Moreno y Alvar, 2002). Las infecciones experimentales en perros se han realizado desde comienzos del siglo XX, cuando su papel como reservorio fue confirmado (Moreno y Alvar, 2002).

Debe tenerse en cuenta que los resultados de la infección experimental dependen tanto de la respuesta inmunitaria del hospedador, como de la virulencia del aislado inoculado, dosis infectante y vía de inoculación (Moreno y Alvar, 2002). En las infecciones experimentales llevadas a cabo en perros (**Tabla V**) se han utilizado tanto amastigotes (Maia *et al.*, 2010; Martínez-Subiela *et al.*, 2011) como promastigotes (Rosypal *et al.*, 2005a; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007a; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013) mediante administración intravenosa (i.v.) (Molano *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2014) o intradérmica (i.d.) (Killick-Kendrick *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 2013), y con una dosis infectante variable, oscilando entre miles y millones de parásitos (Moreno y Alvar, 2002; Maia *et al.*, 2010; Martínez-Subiela *et al.*, 2011). Todos estos parámetros pueden inducir manifestaciones clínicas variables.

Tabla V. Modelos experimentales caninos de leishmaniosis.

Referencia	Raza	Nº perros	Vía de administración	Forma infectante	Tamaño del inóculo	Seroconversión (p.i.)
Killick-Kendrick <i>et al.</i> , 1994	Beagle	25	i.d. (muslo)	Promastigotes (+ saliva de <i>P. perniciosus</i>)	5-8.000	1-2 años
Carrera <i>et al.</i> , 1996	Beagle	6	i.v.	amastigotes	$5,8 \times 10^8$	1-2 meses
Riera <i>et al.</i> , 1999	Beagle	6	i.v.	promastigotes	5×10^7	1-3 meses
Campino <i>et al.</i> , 2000	Varias razas	7	i.v.	Promastigotes y amastigotes	10^9 /kg peso	3 meses (amastigotes)
Molano <i>et al.</i> , 2003	Beagle	20	i.v.	Promastigotes	5×10^5	d.s.p.
Rosypal <i>et al.</i> , 2005	Beagle	8	i.v.	Promastigotes	2×10^8 ó 1×10^7	3 meses
Rodríguez-Cortés <i>et al.</i> , 2007	Beagle	6	i.v.	Promastigotes	5×10^7	3-5 meses.
Carcelén <i>et al.</i> , 2009	Beagle	21	i.v.	Promastigotes	5×10^5	d.s.p.
Travi <i>et al.</i> , 2009	Varias razas		i.d./i.v.	Promastigotes	10^4 ó 10^5	d.s.p.
Maia <i>et al.</i> , 2010	Beagle	12	i.v.	Amastigotes	1×10^7 /kg peso	1-4 meses
Martínez-Subiela <i>et al.</i> , 2011	Beagle	6	i.v.	Amastigotes	$8,6 \times 10^8$	d.s.p.
Fernández-Cotrina <i>et al.</i> , 2013	Beagle	25	i.v.	Promastigotes	5×10^5	3-5 meses
Costa <i>et al.</i> , 2013	Beagle	35	i.d. (oreja)	Promastigotes (+ saliva de <i>L. longipalpis</i>)	10^7	3 (37,1%)-6 (62,9%) meses
Martín <i>et al.</i> , 2014	Beagle	20	i.v.	Promastigotes	$10^{8,5}$	90-105 semanas
Cruz-Chan <i>et al.</i> , 2014*	Beagle	6	i.d.	Promastigotes	7×10^7	4-8 semanas

d.s.p.: datos sin publicar. *Infección experimental con *L. mexicana*. (En el resto de publicaciones se empleó *L. infantum*.)

Mediante cultivos se pueden obtener fácilmente grandes cantidades de promastigotes (Abranches *et al.*, 1991; Paranhos-Silva *et al.*, 2003). Además, su uso, en lugar de amastigotes se asemeja más a la infección natural, pero tienen la desventaja de ser menos infectantes cuando se inoculan en la piel (Poot *et al.*, 2005), especialmente tras sucesivos pases en medio de cultivo (Bhaumik *et al.*, 2008). Estas diferencias pueden deberse a que en condiciones naturales, junto con los promastigotes se inocula la saliva del flebotomo en el hospedador, lo que favorece el progreso de la infección (Norsworthy *et al.*, 2004). Por ello, en algunos ensayos se han inoculado promastigotes metacíclicos, derivados de flebotomos infectados experimentalmente, junto con saliva del vector para incrementar el poder infectante del parásito (Pinelli *et al.*, 1994; Paranhos-Silva *et al.*, 2003; Travi *et al.*, 2009). Algunos autores afirman que los amastigotes son más eficaces induciendo infección y, respecto a los promastigotes, produciendo signos clínicos (Campino *et al.*, 2000; Maia *et al.*, 2010).

La inoculación i.v. de una carga media-alta de promastigotes supone el modelo experimental ideal, ya que produce la infección en el 100% de los animales, así como un cuadro clínico temprano y patente en la mayoría de los perros, debido a la diseminación rápida de los parásitos vivos a diferentes órganos (Moreno y Alvar, 2002; Poot *et al.*, 2005; Fernández-Cotrino *et al.*, 2013). Por el contrario, la inoculación i.d. produce respuestas clínicas más heterogéneas y requiere periodos de prepatencia mayores (Moreno y Alvar, 2002; Paranhos-Silva *et al.*, 2003). El tamaño del inóculo varía mucho en las infecciones naturales y experimentales, siendo menor en las primeras (aproximadamente 1.000 parásitos). En el modelo experimental, un número elevado de parásitos (10^8 - 10^9) suele inducir una respuesta homogénea en todos los individuos, mientras que concentraciones menores (10^5 - 10^6)

tienden a dar lugar a respuestas clínicas heterogéneas (Moreno y Alvar, 2002).

La mayoría de los modelos experimentales caninos se han centrado en estudiar la forma visceral de la enfermedad, pero recientemente se ha presentado un modelo experimental de Lcan cutánea con *L. mexicana* (Cruz-Chan *et al.*, 2014). Seis perros de raza Beagle fueron infectados vía i.d. con promastigotes de *L. mexicana* y todos desarrollaron las características úlceras ovaladas en un periodo de 3-4 semanas p.i. Dichas lesiones curaron en una media de 8 semanas, no observándose amastigotes microscópicamente, aunque sí se detectó ADN del parásito mediante qPCR hasta 15 semanas después.

El periodo de prepatencia en infecciones experimentales en perros, basado en la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania*, suele oscilar entre 90-120 días (Carcelén *et al.*, 2009; Travi *et al.*, 2009; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013) o del parásito (Poot *et al.*, 2005; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007a). En cambio, en infecciones naturales el periodo de prepatencia es superior, aproximadamente 6 meses, lo cual puede deberse a la carga parasitaria menor inoculada por el flebotomo (Fernández-Cotrina *et al.*, 2013). Además, el número reducido de perros empleados en la mayoría de los ensayos, por razones éticas obvias, dificulta obtener conclusiones definitivas.

Entre las diversas razas de perros empleadas, algunos autores afirman que los perros de raza Pastor Alemán son mejores modelos experimentales que los Beagles y perros mestizos (Keenan *et al.*, 1984). No obstante, se han descrito tasas de infección altas en perros mestizos (Abranches *et al.*, 1991), y los perros de raza Beagle son los que más se han empleado en infecciones experimentales, obteniéndose altas tasas de

infección (Carrera *et al.*, 1996; Travi *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2010; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013).

El principal problema de las infecciones experimentales es la naturaleza impredecible de la respuesta, hecho considerado por algunos investigadores como un reflejo del amplio abanico de respuestas clínicas observadas en las infecciones naturales (Garg y Dube, 2006). Los diferentes patrones clínicos tras la infección en los estudios se han observado incluso empleando perros de la misma raza (Killick-Kendrick *et al.*, 1994; Leandro *et al.*, 2001; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007a; Costa *et al.*, 2013).

2.2.6. Factores de riesgo

El principal factor de riesgo que influye en el aumento de la incidencia de la leishmaniosis lo constituye la presencia de flebotomos infectados con *L. infantum* (Suárez *et al.*, 2012).

Existen una serie de factores asociados al vector que favorecen el riesgo de transmisión de la infección, entre los que se encuentran factores climáticos (temperatura ambiente, humedad, viento), abundancia de materia orgánica en descomposición o escombros en los alrededores de las viviendas, y la presencia de reservorios (Sharma y Singh, 2008). Las actividades humanas que causen un impacto ambiental, como cambios demográficos y el calentamiento global de la Tierra, pueden incrementar la población de flebotomos, y por tanto, el número de casos de leishmaniosis (Gálvez *et al.*, 2010b; Vilas *et al.*, 2012; Arce *et al.*, 2013).

Numerosos estudios epidemiológicos han descrito una serie de factores asociados al hospedador que predisponen al desarrollo de la enfermedad en los perros infectados, entre los que se encuentran la edad, el

sexo, la raza, la aptitud, la predisposición genética, situaciones de inmunosupresión y el hábitat (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

La **edad** parece ser un factor de riesgo importante ya que se ha detectado una distribución bimodal de prevalencia de la enfermedad: en edades tempranas hasta los 3-4 años y a partir de los 7-8 años (Amela *et al.*, 1995; Cardoso *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2008; Gálvez *et al.*, 2010b; Miró *et al.*, 2012). El incremento de la seroprevalencia de Lcan en perros jóvenes podría relacionarse con una predisposición genética o con la inmadurez inmunitaria que presentan, haciéndoles más vulnerables a la infección en los primeros años de vida. La segunda elevación observada en perros de mayor edad puede deberse, bien a la acumulación del tiempo de exposición al vector, la presencia de otras enfermedades concomitantes, infecciosas o neoplásicas, o a la instauración de una terapia inmunosupresora, de forma que en casos de infección latente (adquirida seguramente en los primeros meses de vida) pueden sufrir una reactivación de la misma (Cabral *et al.*, 1998; Miranda *et al.*, 2008; Gálvez *et al.*, 2010b). Otros estudios muestran una menor tasa de infección en perros menores de dos años, mientras que los perros con edades comprendidas entre 5-8 años (Cortés *et al.*, 2012) y mayores de 7 años (Miró *et al.*, 2007b) son los que se infectan con más frecuencia. De forma similar, Cardoso *et al.* (2004) observaron un riesgo de seropositividad en los animales de 9-11 años, dos veces superior al de los perros menores de dos años.

El **sexo** por lo general no se considera un factor determinante (Amela *et al.*, 1995; Miró *et al.*, 2007b; Gálvez *et al.*, 2010b; Cortes *et al.*, 2012; Schallig *et al.*, 2013). Sin embargo, algunos autores señalan una mayor prevalencia en machos (Fisa *et al.*, 1999; Zivicnjak *et al.*, 2005; Dantas-Torres *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2008), lo cual podría atribuirse a su mayor comportamiento itinerante (Miranda *et al.*, 2008).

Aunque en teoría, todas las **razas** son susceptibles a la infección por *L. infantum*, el Podenco Ibicenco y mestizos de dicha raza se consideran más resistentes a la infección (Solano-Gallego *et al.*, 2000) y no suelen presentar signos clínicos (Chicharro *et al.*, 2005). Esta resistencia se debe a que esta raza presenta una respuesta inmune celular específica frente a *L. infantum* mayor a otras razas. El Caniche o el Yorkshire Terrier parecen presentar porcentajes significativamente más bajos de infección comparados con las poblaciones de referencia (Miranda *et al.*, 2008). Por el contrario, perros de raza Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler, Doberman y Pastor Alemán parecen ser más susceptibles a padecer la enfermedad (França-Silva *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2008; Quilez *et al.*, 2012). Cortés *et al.* (2012) observaron que los perros mestizos eran menos propensos a la infección, mientras que los perros de razas exóticas puras poseían mayor riesgo. A su vez, se ha descrito un mayor riesgo en los perros de pelo corto, lo que facilitar la picadura de los flebotomos (França-Silva *et al.*, 2003).

Además, existe una **predisposición genética**, de forma que en la susceptibilidad a padecer la Lcan están involucrados el gen *Slc11c1* (*Solute carrier family 11 member a1*), anteriormente denominado N-RAMPI, y determinados alelos de genes del CMH II (Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II) (Quinnell *et al.*, 2003b; Sanchez-Robert *et al.*, 2005; 2008).

Asociada a la raza se encuentra el **tamaño** del animal, el cual es considerado en algunos estudios como una variable epidemiológica relacionada con la infección por *L. infantum*, de manera que se han observado seroprevalencias más elevadas en razas grandes que en razas pequeñas (Martín-Sánchez *et al.*, 2009; Gálvez *et al.*, 2010b; Miró *et al.*, 2012). Una posible explicación sería que una mayor masa corporal conlleva una mayor superficie expuesta a la picadura del vector, como se ha sugerido

para otras enfermedades transmitidas por vectores en perros, como la thelaziosis (Miró *et al.*, 2011b). Este hecho también podría estar relacionado con la **aptitud** del perro, ya que los perros de talla media/grande son los más frecuentemente utilizados en actividades de pastoreo o guarda, pasando periodos de tiempo más largos en el exterior y estando por tanto, más tiempo expuestos a los flebotomos (Alonso *et al.*, 2010; Gálvez *et al.*, 2010b; Cortes *et al.*, 2012; Miró *et al.*, 2013). A su vez, los machos se emplean más frecuentemente que las hembras como perros de guarda, lo que implica un mayor riesgo de infección en estos.

En cuanto al **hábitat**, se ha descrito que los perros que viven en zonas rurales o periurbanas, donde las viviendas con patios y jardines son frecuentes y en cuyos alrededores abundan perros infectados, poseen más riesgo de ser infectados (Moreno y Alvar, 2002; Solano-Gallego *et al.*, 2006; Schallig *et al.*, 2013). Esto ha llevado a la “urbanización” del ciclo de transmisión de *L. infantum* (Carrillo *et al.*, 2013).

2.3. INMUNOPATOLOGÍA

2.3.1. Respuesta inmunitaria frente a la infección por *L. infantum* en el perro

2.3.1.1. Respuesta inmunitaria innata

Cuando una hembra de flebotomo pica a un hospedador vertebrado, tras la inoculación intradérmica, ésta ingiere sangre y se produce una reacción inflamatoria cutánea local, en la que intervienen células centinelas de la piel, como las células dendríticas (CD), linfocitos T y δ y macrófagos (Teixeira *et al.*, 2006). Estas células contienen receptores *Toll-like* (TLR) en su superficie, capaces de reconocer patrones moleculares conservados (PAMP) asociados a patógenos (Janeway y Medzhitov, 2002; Tuon *et al.*, 2008). Durante este proceso se liberan una serie de quimioquinas que inducen el

reclutamiento de neutrófilos y células *natural killer* (NK), seguidos de una oleada de macrófagos, iniciando la cascada de la respuesta inmunitaria innata para combatir los parásitos en el lugar de la infección (Santos-Gomes *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2006). Las quimioquinas y las células reclutadas durante las primeras fases de la infección podrían condicionar la resistencia a la enfermedad (Teixeira *et al.*, 2006).

La saliva de los flebotomos contiene moléculas bien caracterizadas con efecto no sólo anticoagulante y antiinflamatorio, sino también inmunomodulador (Sacks y Kamhawi, 2001) así como otras moléculas no caracterizadas que, en menos de dos horas tras la inoculación atraen neutrófilos, monocitos y macrófagos (Anjili *et al.*, 1995; Zer *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005).

Inicialmente, los parásitos se enfrentan a moléculas del complemento, anticuerpos y células fagocíticas, que serán capaces de destruir hasta el 80% de los promastigotes (Lewis y Peters, 1977). La supervivencia de los parásitos es posible mediante la invasión de la célula diana, el macrófago, de lo contrario serían rápidamente destruidos por el sistema del complemento (de Almeida *et al.*, 2003), neutrófilos y células NK (Pimenta *et al.*, 1987). Los neutrófilos son las primeras células en llegar al punto de inoculación y predominan durante los primeros días post-infección, se infectan y pueden destruir los parásitos o ser fagocitados por los macrófagos cutáneos (de Almeida *et al.*, 2003). No obstante, la afluencia temprana de neutrófilos ha demostrado ser beneficiosa para la supervivencia de *Leishmania* en el tejido infectado, utilizando los granulocitos como un “caballo de Troya” para alcanzar sus células diana de manera “silente” pasando desapercibidos (Laskay *et al.*, 2003; van Zandbergen *et al.*, 2004). En perros susceptibles la actividad fagocítica de los neutrófilos está aumentada

pero su capacidad para eliminar los parásitos intracelulares está suprimida (Brandonisio *et al.*, 1996).

Los macrófagos son los segundos en llegar al punto de entrada de *Leishmania*. Entre sus múltiples funciones destacan su papel como: células diana para la replicación del parásito, ser células presentadoras de antígenos (CPA) y fuente de citoquinas moduladoras de la respuesta inmune mediada por linfocitos T (LT). Además, tras ser activadas por LTh1 son capaces de provocar la muerte parasitaria intracelular (Teixeira *et al.*, 2006).

Las células NK llegan al punto de entrada 24 horas tras la inoculación (Müller *et al.*, 2001), producen IFN- γ , y su actividad temprana podría influir en la cinética de la respuesta Th1 (Teixeira *et al.*, 2006).

Las CD de la piel, potentes CPA, también se infectan, ya que los parásitos son inoculados en la dermis, donde se encuentran estas células (Saint-André Marchal *et al.*, 1997; Ferrer, 2002). Mediante una activación regulada por el CMH I y II, las CD transportan los parásitos desde la piel infectada hasta los LN presentándolos a LT antígeno-específicos (Moll, 2000). Las células de Langerhans (CL), presentes en la epidermis, también pueden infectarse si los amastigotes viajan en dirección inversa a la epidermis, o durante la migración de dichas células de la sangre a la piel (Saint- André Marchal *et al.*, 1997). Tanto las CD como las CL, al igual que los macrófagos, transportan los amastigotes a los LN regionales para presentar sus antígenos a los LT, a través de moléculas del CMH, que en perros resistentes están muy implicadas en el desarrollo de la inmunidad celular (Saint-André Marchal *et al.*, 1997; Ferrer, 2002; Sacchi *et al.*, 2006).

Los promastigotes metacíclicos deben evadir en primer lugar la lisis mediada por el complemento, para posteriormente adherirse a los receptores de los macrófagos. Posteriormente, son fagocitados y localizados

en el interior de una vacuola parasitófora (Rittig y Bogdan, 2000; Ferrer, 2002; Bañuls *et al.*, 2007). En los perros susceptibles, la capacidad fagocítica de estas células es reducida, debido probablemente, a la formación de inmunocomplejos (IC) (Brandonisio *et al.*, 1986; Brandonisio *et al.*, 1990). Los macrófagos transportan los parásitos, primero a los LN regionales, y después al resto del organismo. Esta diseminación dependerá de la resistencia del hospedador, de manera que en animales susceptibles la diseminación puede ocurrir en horas, mientras que en animales resistentes pueden permanecer confinados en la piel y LN regionales (Ferrer, 2002). Además del transporte, los macrófagos presentan los antígenos del parásito a los LT, mediante las moléculas del CMH (Ferrer, 2002).

2.3.1.2. Respuesta inmunitaria adquirida

2.3.1.2.1. Respuesta inmunitaria de base celular

La inmunidad protectora en la Lcan está muy probablemente mediada por la acción del factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), la interleuquina 2 (IL-2) y el interferón gamma (IFN- γ) secretados por los LT activados, para a su vez activar la función leishmanicida de los macrófagos a través de la producción de NO, responsable de la muerte parasitaria intracelular mediante apoptosis a través de la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) (Liew *et al.*, 1991; Pinelli *et al.*, 1994; Holzmüller *et al.*, 2006). Estudios recientes han demostrado que el índice de apoptosis en la Lcan está directamente relacionado con la carga parasitaria, la intensidad de la respuesta inflamatoria y la gravedad del cuadro clínico (Verçosa *et al.*, 2012).

Parece ser que el IFN- γ producido por los PMNN estimulados, es insuficiente por sí solo para producir una respuesta eficaz frente a Lcan,

siendo necesarios otros co-factores, como el FNT- α (Carrillo y Moreno, 2009).

Los macrófagos infectados son lisados por LT citotóxicos CD8+ en un proceso regulado por el CMH, el cual se suprime en perros enfermos con una carga parasitaria elevada (Pinelli *et al.*, 1994; De Luna *et al.*, 1999). En perros asintomáticos, con baja carga parasitaria, prevalecen los LT CD8+ (Reis *et al.*, 2006b; Guerra *et al.*, 2009).

Los macrófagos portan los amastigotes fagocitados desde la piel hasta los LN, exponiendo los antígenos a los LT, activándolos. Los LT migran vía hemolinfática a la zona afectada, favoreciendo la respuesta inmunitaria. Existen dos tipos de respuesta mediada por los LT, una repuesta celular Th1 asociada a la inmunidad protectora y otra respuesta humoral Th2 asociada a la progresión o susceptibilidad de la enfermedad (Baneth *et al.*, 2008) (**Fig. 9**). En los perros que presentan una multiplicación descontrolada y diseminación de los parásitos la producción de citoquinas inducidas por respuestas tanto Th1 como Th2 es baja (Santos-Gomes *et al.*, 2002; Carrillo y Moreno, 2009).

La mayoría de los perros infectados por *Leishmania* expresan una respuesta inmunitaria celular, que se manifiesta por una fuerte proliferación linfocitaria *in vitro* y una respuesta positiva a la inyección intradérmica de leishmanina (Cardoso *et al.*, 1998; Maia y Campino, 2008). La ineficiente inmunidad celular presente en estos animales lleva a una inflamación granulomatosa compensatoria y una exacerbada inmunidad humoral, resultando en el depósito de IC en órganos diana y/o la generación elevada de anticuerpos no protectores (Martínez-Moreno *et al.*, 1995; Koutinas y Koutinas, 2014).

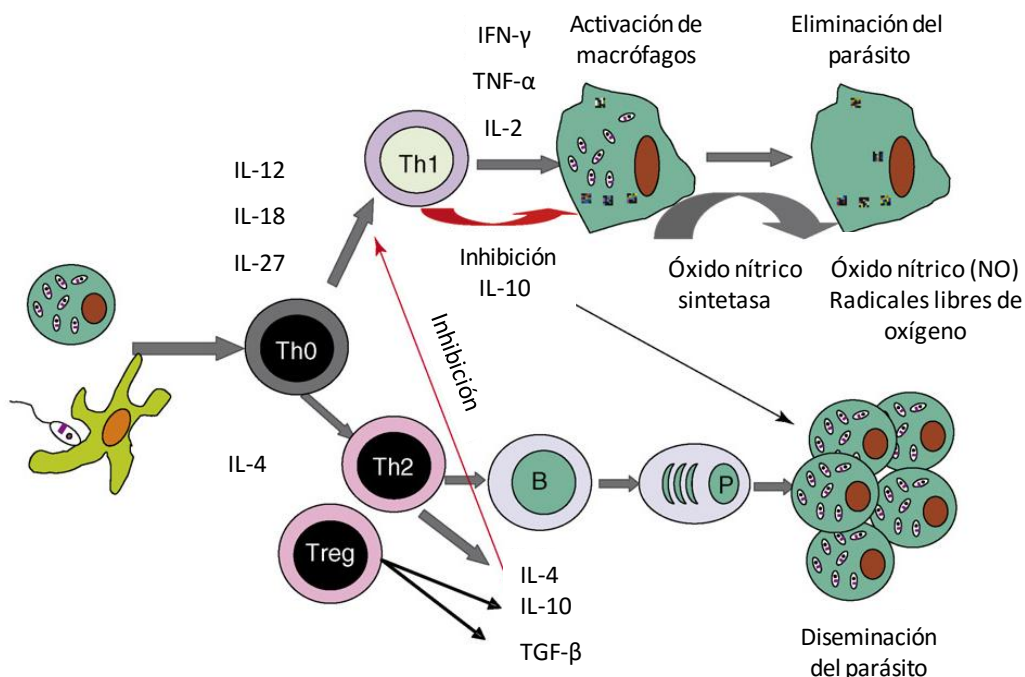


Figura 9. Representación de la respuesta inmunitaria regulada por linfocitos T colaboradores y linfocitos T citotóxicos en la Lcan. Una respuesta temprana mixta Th1 y Th2 puede dar lugar tanto a una respuesta Th1, la cual producirá una inmunidad protectora o, alternativamente, a una respuesta Th2, dando lugar a la enfermedad clínica. Determinadas citoquinas, como la IL-12, pueden desencadenar respuestas Th1, las células T CD8+ tendrán actividad citolítica y podrán secretar citoquinas activadoras de macrófagos. Fuente: Baneth *et al.*, 2008.

2.3.1.2.2. Respuesta inmunitaria de base humoral

La Lcan se asocia con una respuesta humoral marcada, no protectora y con un control ineficaz de la infección. Existe una correlación positiva entre la concentración de anticuerpos IgG *Leishmania*-específicos, la carga parasitaria en los tejidos y el cuadro clínico en el animal (Oliva *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2006a; 2006c; Dos-Santos *et al.*, 2008; Boggiatto *et al.*, 2010).

Diversos estudios han intentado encontrar una asociación entre los subisotipos IgG1 e IgG2 con el tipo de respuesta Th y el cuadro clínico, pero no se ha alcanzado un consenso sobre si la respuesta inmune humoral está polarizada en la Lcan. Algunos autores describen una correlación negativa

entre IgG1 con la aparición de signos clínicos en animales infectados (Vercammen *et al.*, 2002; Cordeiro-da-Silva *et al.*, 2003; de Freitas *et al.*, 2012). En cuanto a las concentraciones séricas de IgG2, de Freitas *et al.* (2012) no observaron diferencias entre animales infectados clínicamente sanos y enfermos, mientras que otros autores (Leandro *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001c) hallaron niveles superiores de esta subclase en perros enfermos.

Los resultados contradictorios obtenidos posiblemente se deban a la falta de especificidad de los reactivos comerciales y a la inconsistencia en la nomenclatura empleada (Day, 2007; Carson *et al.*, 2010). Además, el uso de anticuerpos monoclonales ha puesto de manifiesto que tanto IgG1 como IgG2 aumentan en los animales infectados sin mostrar asociación con la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad (Quinnell *et al.*, 2003a; Strauss-Ayali *et al.*, 2007; Boggiatto *et al.*, 2010).

El papel perjudicial de la activación de LB y la superproducción de inmunoglobulinas producen la formación de IC compuestos por IgG y las fracciones C1, C2 y C4 del complemento (Makni *et al.*, 1989). La hipergammaglobulinemia asociada produce, directa e indirectamente, alteraciones patológicas mediante la generación de auto-anticuerpos (p.e. trombocitopenia inmunitaria), anticuerpos anti-histonas (p.e. glomerulonefritis), y/o IC circulantes (p.e. vasculitis, uveítis, poliartritis) (Brandonisio *et al.*, 1990; Lopez *et al.*, 1996; Cortese *et al.*, 2009; Alvar *et al.*, 2004; Ginel *et al.*, 2008). Dichos IC solubles también reducen la actividad fagocítica de los macrófagos y aumentan la inflamación mediada por la activación del complemento (Saridomichelakis, 2009).

2.3.2. Patología de la leishmaniosis canina

A pesar de existir diferencias en los cuadros clínicos observados en la Lcan entre las distintas especies de *Leishmania* (p.e. *L. braziliensis* causa cuadros cutáneos y mucocutáneos; *L. infantum* produce un cuadro clínico generalizado con o sin signos cutáneos), no se ha encontrado asociación entre los distintos zimodemas de *L. infantum* y la diversidad clínica encontrada entre la Lcan típica de la cuenca mediterránea y la observada en Brasil (Almeida *et al.*, 2005; Dantas-Torres, 2009). Independientemente del zimodema implicado, los pilares de la patogenia de Lcan, que son resultado de una compensación ineficaz de una respuesta inmune celular frente al parásito, incluyen 1) una marcada respuesta humoral, 2) con el consiguiente depósito de IC en los órganos diana (p.e. glomérulos renales, córnea, membrana sinovial articular, pared vascular), y 3) una reacción inflamatoria granulomatosa desmesurada (p.e. hígado) (Koutinas y Koutinas, 2014). Dichos mecanismos son responsables del amplio abanico de signos clínicos y la extensa distribución del parásito por el organismo en la Lcan, al contrario de lo que ocurre en personas con infección por *L. infantum* donde el parásito se limita a invadir el hígado, bazo y MO (Alvar *et al.*, 2004).

Desde la piel, los parásitos son transportados por sangre o linfa a los LN y el bazo y, posteriormente, a otros órganos como hígado y riñones. A continuación, los parásitos se pueden aislar en la totalidad del organismo en el perro (Alvar *et al.*, 2004).

La inflamación granulomatosa se caracteriza por un infiltrado y/o proliferación de macrófagos, histiocitos, linfocitos, células plasmáticas y en algunas ocasiones neutrófilos y eosinófilos, que afecta fundamentalmente a LN, MO, bazo, hígado, intestino, huesos, aparato genital masculino y mucosas (Saridomichelakis, 2009).

En los LN se produce una hipertrofia cortical y medular con abundantes macrófagos infectados, ocasionando **linfadenomegalia periférica**, uno de los signos clínicos más característicos de Lcan (Lima *et al.*, 2004; Giunchetti *et al.*, 2008b).

El bazo se considera un órgano clave para la supervivencia del parásito a largo plazo debido a una respuesta inmunitaria ineficaz (Lima *et al.*, 2007). La **esplenomegalia** es un hallazgo muy común en la Lcan está asociada a un incremento de monocitos y macrófagos, periesplenitis, hiperplasia de las células plasmáticas de los folículos, atrofia y reducción del número de los folículos linfoides, escasez de linfocitos en la banda periarterial, desorganización estructural de la pulpa blanca y cambios en la estructura microvascular con abundantes vénulas y venas en la pulpa y fibras reticulares aumentadas (Tafuri *et al.*, 2001; Alexandre-Pires *et al.*, 2006; Santana *et al.*, 2008). Aunque dichas alteraciones son más frecuentes en perros enfermos, también se observan en perros infectados clínicamente sanos (Sánchez *et al.*, 2004). La presencia de numerosos macrófagos formando estructuras granulomatosas en la pulpa roja en animales susceptibles o enfermos (Tafuri *et al.*, 2001; Santana *et al.*, 2008) muestra la ineficacia para eliminar al parásito (Murray, 2001).

La **hepatomegalia**, causada por congestión pasiva y hepatitis crónica, es muy frecuente en la Lcan (Rallis *et al.*, 2005; Giunchetti *et al.*, 2008c). Además de los macrófagos, también pueden aparecer células de Kupffer y hepatocitos infectados (Tafuri *et al.*, 2001; Rallis *et al.*, 2005). Los animales enfermos presentan granulomas hepáticos desorganizados y son incapaces de eliminar a los parásitos (Sanchez *et al.*, 2004). Entre las alteraciones histopatológicas más frecuentes destacan la degeneración vacuolar y la necrosis de los hepatocitos, hipertrofia/hiperplasia de las células de Kupffer, fibrosis, y esporádicamente amiloidosis (Saridomichelakis, 2009). Los

hepatocitos sufren alteraciones morfológicas, afectándose el metabolismo del hígado, lo que contribuye a muchas de las alteraciones clinicopatológicas de la Lcan, como hipoalbuminemia y aumento de la actividad enzimática en suero, aunque raramente ocasiona fallo hepático funcional (Rallis *et al.*, 2005; Giunchetti *et al.*, 2008c).

El **cuadro digestivo** en perros con Lcan es poco frecuente, y normalmente se manifiesta como diarreas de intestino grueso, con o sin melena, que se corresponden a una colitis ulcerativa granulomatosa (Ferrer *et al.*, 1991; Adamama-Moraitou *et al.*, 2007). En un estudio en el que se realizaron colonoscopias a 31 perros con Lcan, pero sin historia ni signos clínicos previos de colitis, el 32,3% de los animales presentaban amastigotes en la mucosa del colon y aproximadamente en el 25% se detectaron lesiones irregulares hiperémicas, granulares, edematosas y ligeramente erosivas en la mucosa (Adamama-Moraitou *et al.*, 2007). La ausencia de signos clínicos que caracteriza a la colitis crónica o recurrente en perros puede explicarse por el hecho de que las alteraciones endoscópicas y/o lesiones histológicas no siempre se correlacionan con la gravedad del cuadro clínico (Guilford, 1996). En un estudio más reciente en el que se examinó histológicamente el tracto gastrointestinal de perros con Lcan, con y sin signos clínicos, se hallaron lesiones leves en toda su longitud junto con una evidente distribución parasitaria en todos los segmentos estudiados, y una carga parasitaria superior en el ciego y colon, independientemente del cuadro clínico (Pinto *et al.*, 2011). Dichos resultados podrían reflejar la capacidad de *Leishmania* de beneficiarse de una tolerancia inmunológica intestinal.

En cuanto a la mucosa oral, se han descrito diversas lesiones en la lengua, principalmente en forma de nódulos, pápulas o como glositis ulcerativa multifocal o difusa y estomatitis, afectando con mayor frecuencia al paladar duro. Dichas lesiones se han atribuido, bien a la migración de

macrófagos infectados secundaria a traumatismos leves de la mucosa oral, o bien a la ingestión accidental de flebotomos infectados (Lamothe y Poujade, 2002; Foglia Manzillo *et al.*, 2005; Parpaglia *et al.*, 2007; Viegas *et al.*, 2012) o a que se producen picaduras en la lengua cuando los perros duermen con la boca abierta (Foglia Manzillo *et al.*, 2009).

Las **lesiones óseas y articulares** son frecuentes en perros infectados. A nivel óseo, se ha descrito osteomielitis granulomatosa secundaria a la distribución hemática de los parásitos y osteólisis (Agut *et al.*, 2003; de Souza *et al.*, 2005). Radiográficamente los huesos afectados muestran lesiones proliferativas intramedulares y del periostio con osteólisis cortical y medular (Agut *et al.*, 2003; de Souza *et al.*, 2005). La patología articular es muy frecuente, produciendo cojeras y poliartritis que pueden ser bilateral y simétrica, o tanto erosiva como no erosiva (Agut *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2006; Saridomichelakis, 2009). Blavier *et al.* (2001) proponen dos teorías sobre la etiología de la poliartritis en la Lcan: 1) la presencia de una elevada carga parasitaria provoca una sinovitis granulomatosa y 2) el depósito de IC en el líquido sinovial produce una reacción de hipersensibilidad tipo III que finalmente acaba atrayendo neutrófilos con la consiguiente destrucción articular mediante enzimas hidrolíticas. En la mayoría de los casos, no se detectan amastigotes de *L. infantum* en el aspirado del líquido sinovial, a no ser que haya un elevado número de parásitos en la citología, por lo que debe incluirse esta infección en el diagnóstico diferencial de artritis inflamatorias.

La **atrofia muscular** progresiva está asociada a polimiositis crónica caracterizada por la presencia de infiltrados mononucleares con amastigotes de *Leishmania*, vasculitis neutrofílica e IC en el tejido muscular junto con la producción de anticuerpos frente a fibras musculares (Vamvakidis *et al.*, 2000). La musculatura más afectada por la atrofia progresiva es la facial (músculos temporal y maséters), aunque no afecta a la masticación

(Vamvakidis *et al.*, 2000). La polimiositis de músculos esqueléticos en Lcan afecta fundamentalmente a la musculatura apendicular ocasionando debilidad muscular progresiva, cojera e intolerancia al ejercicio. Dicha polimiositis suele ser subclínica, con tan sólo unos pocos casos descritos (Vamvakidis *et al.*, 2000; Paciello *et al.*, 2009).

La **epistaxis, hematuria y diarrea hemorrágica** están asociadas con la ulceración de tejidos y alteraciones en la hemostasis primaria y secundaria (Baneth *et al.*, 2008). Los cambios hemostáticos descritos en la Lcan incluyen alteraciones en la agregación plaquetaria, que conduce a una disfunción plaquetaria, trombocitopenia, reducción en la fibrinólisis y factores de coagulación, probablemente debidas a la hepatitis crónica y fibrinólisis (Moreno, 1999; Ciaramella *et al.*, 2005). La epistaxis puede tener una presentación aguda o crónica/recurrente, unilateral o bilateral, pudiendo llegar a poner en peligro la vida del animal por una pérdida incontrolada de sangre. Las principales causas de epistaxis en la Lcan incluyen trombocitopenia, incremento de la viscosidad sérica debido a hipergammaglobulinemia y rinitis piogranulomatosa o linfoplasmocitaria (ulcerativa o no ulcerativa) (Koutinas *et al.*, 1999; Jüttner *et al.*, 2001; Petanides *et al.*, 2008).

Las **manifestaciones clínicas cutáneas** son muy comunes, estando presentes en aproximadamente el 80-90% de los casos de Lcan (Koutinas *et al.*, 1999; Miró y Molina, 2006). La tasa de alteraciones cutáneas podría ser incluso mayor, como se ha demostrado a partir de biopsias de piel intacta de perros con Lcan (Solano-Gallego *et al.*, 2004; Papadogiannakis *et al.*, 2005).

La manifestación cutánea más frecuente es una forma queratoseborreica caracterizada por una dermatitis exfoliativa, con descamación, eritema, de distribución generalmente simétrica, localizada

inicialmente en la cabeza y extremidades y que se va extendiendo por todo el cuerpo. Por lo general, la descamación no se acompaña de prurito y precede a la alopecia, que tiende a ser parcial, en lugar de generalizada (Papadogiannakis *et al.*, 2005; Miró y Molina, 2006). El examen histológico de estas lesiones revela una hiperqueratosis ortoqueratósica, epidérmica y folicular, siendo las células inflamatorias predominantes macrófagos, células plasmáticas y linfocitos (Ordeix i Esteve y Fondati, 2013).

La dermatitis ulcerativa es otra manifestación cutánea observada en algunos perros con Lcan y se caracteriza por la aparición de úlceras crónicas (únicas o múltiples), y que afectan comúnmente a los márgenes del pabellón auricular, los relieves óseos y uniones mucocutáneas (Ordeix i Esteve y Fondati, 2013). Algunas de estas úlceras se asocian a vasculitis inmunomediadas (Koutinas *et al.*, 1999).

El “chancro de inoculación” es la lesión cutánea primaria, producida por el vector en el punto de inoculación y su aspecto es similar a la lesión típica de la LC humana o “Botón de Oriente”. Afecta principalmente a perros jóvenes y conlleva una diseminación parasitaria restringida y un pronóstico bueno (Lombardo *et al.*, 2014). Clínicamente se caracteriza por la presencia de un número variable de pápulas asimétricas y apruríticas, localizadas en zonas desprovistas de pelo (Ordeix i Esteve y Fondati, 2013). Aproximadamente aparece a los 20 días de la infección y sufre una evolución con tres fases clínicas diferentes: eritemo-escamosa, ulcero-costrosa (de mayor tamaño) y precicatricial (Miró y Molina, 2006). Se ha asociado en algunos animales con una buena respuesta inmunitaria celular específica, en la que no suelen aparecer alteraciones clínicas ni clinicopatológicas y tanto el nivel de anticuerpos anti-*Leishmania* como la carga parasitaria local son bajos o nulos (Lombardo *et al.*, 2014). Estas lesiones pueden persistir hasta seis meses antes de su desaparición espontánea, periodo durante el cual la

mayor parte de los animales son seronegativos. En Europa esta es la forma cutánea más común de la infección causada por *L. infantum* en los seres humanos, e incluso se ha descrito en caballos (Solano-Gallego *et al.*, 2003a).

La onicogriposis es un signo clínico tardío y de carácter crónico que se caracteriza por la hipertrofia y curvatura anormal de las uñas (Koutinas *et al.*, 2010). Comúnmente se presenta asociada a dermatitis exfoliativa, y al igual que la hiperqueratosis nasal y plantar representa una manifestación localizada de ésta (sobrecrecimiento excesivo del estrato córneo) (Koutinas y Koutinas, 2014). Los cambios histológicos consisten en una dermatitis de la unión dermoepidérmica con un infiltrado mononuclear y sin la presencia o en cantidad muy baja de amastigotes (Koutinas *et al.*, 2010).

Otra presentación cutánea es la forma nodular, caracterizada por la aparición de nódulos indoloros, únicos o múltiples y ulcerados a veces (Blavier *et al.*, 2001). A diferencia de la dermatitis papular, estos nódulos se localizan en zonas cubiertas de pelo. A nivel histológico se corresponden con granulomas parasitarios donde se aprecian un número reducido de LT y numerosos macrófagos y amastigotes (Saridomichelakis, 2009).

Otras presentaciones cutáneas en la Lcan incluyen la dermatitis pustular estéril, alopecia multifocal, despigmentación nasal, hiperqueratosis plantar y nasal, paroniquia, dermatofibrosis nodular, vasculitis y complicaciones secundarias como piodermas superficiales y/o profundas, sobrecrecimiento de *Malassezia pachydermatis*, dermatofitosis y demodicosis (Blavier *et al.*, 2001; Koutinas y Koutinas, 2014).

Las prevalencia de **lesiones oculares y perioculares** descrita en la Lcan oscilan entre el 16% y 80,5%, pudiendo llegar a ser la única manifestación clínica en un 15% de los casos clínicos (Peña *et al.*, 2000; Baneth *et al.*, 2008; Koutinas y Koutinas, 2014). La manifestación ocular más

frecuente es la uveítis anterior, caracterizada por edema, miosis, formación de fibrina en la cámara anterior y múltiples nódulos en el cuerpo del iris (García-Alonso *et al.*, 1996; Peña *et al.*, 2000). La uveítis posterior que suele acompañar a la uveítis anterior se diagnostica con menor frecuencia. La uveítis puede tener una base inmunológica o alérgica similar a la leishmaniosis post-kala-azar de los humanos y puede terminar produciendo glaucoma y panofalmitis con pérdida de visión permanente (Koutinas y Koutinas, 2014). Otras manifestaciones oculares incluyen conjuntivitis (nodular), blefaritis (exfoliativa, ulcerativa o nodular), queratitis, queratoconjuntivitis seca, endoftalmitis, coriorretinitis multifocal acompañada de desprendimiento de retina y hemorragias retinianas (Molleda *et al.*, 1993; García-Alonso *et al.*, 1996; Peña *et al.*, 2000; Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011). La queratoconjuntivitis seca puede ser el único signo clínico presente y se caracteriza por una descarga purulenta y viscosa, sequedad, ulceración de la córnea y neovascularización. Entre las causas descritas están la destrucción de las glándulas lagrimales y de Meibomio debido a la inflamación granulomatosa u obstrucción de los conductos lagrimales (Naranjo *et al.*, 2005).

Existen diferentes mecanismos patogénicos según la lesión producida: 1) inflamación granulomatosa secundaria a la presencia del parásito (blefaritis, conjuntivitis primaria, inflamación de las glándulas lagrimales), 2) depósito de IC (uveítis), 3) lesiones en otras estructuras oculares (conjuntivitis secundaria a alteración del párpado o aparato lagrimal, queratitis asociada a conjuntivitis, queratoconjuntivitis seca por inflamación de la glándula lagrimal y obstrucción del conducto lagrimal inducida por conjuntivitis), y 4) menos frecuentemente manifestaciones sistémicas de Lcan (desprendimiento de retina, hemorragias, glaucoma e

hipema secundarias a hipertensión) (Garcia-Alonso *et al.*, 1996; Peña *et al.*, 2000; Naranjo *et al.*, 2005; Cortadellas *et al.*, 2006; Saridomichelakis, 2009).

Los **trastornos renales** son comunes, hasta el punto de que la insuficiencia renal crónica (IRC) está presente en el 50% de los perros con leishmaniosis (Cortadellas *et al.*, 2006), siendo ocasionalmente la única manifestación clínica presente. La glomerulonefritis, originada por el depósito de IC circulantes debido a una antigenemia constante, es uno de los mecanismos patogénicos más graves de la Lcan, pudiendo progresar desde una proteinuria leve a un síndrome nefrótico y/o enfermedad renal terminal irreversible (síndrome urémico) (Poli *et al.*, 1991; Lopez *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2003; Baneth *et al.*, 2008; Aresu *et al.*, 2013).

Cuando se instaura una IRC con síndrome urémico se produce un incremento de urea y creatinina en sangre, pérdida grave de proteínas en orina y anemia. Se considera la principal causa de muerte en perros con Lcan (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Koutinas y Koutinas, 2014), por lo que es esencial evaluar la función renal con el fin de clasificar el grado de alteración mediante las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Interés Renal (IRIS), ya que el diagnóstico precoz puede prolongar la vida del paciente (Solano-Gallego *et al.*, 2009; IRIS, 2013). A pesar de la elevada prevalencia de la patología renal, la azotemia característica de fallo funcional renal es poco común y sólo es evidente cuando la mayor parte de las nefronas son afuncionales (Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009). En la mayoría de los casos, el único indicio de afección renal es una proteinuria subclínica, la cual puede contribuir al desgaste muscular, caquexia y ocasionalmente tromboembolismo pulmonar (Koutinas y Koutinas, 2014).

Varios estudios han descrito la presencia de lesiones histológicas en el 100% de los perros evaluados (Costa *et al.*, 2003; Zatelli *et al.*, 2003). Las

alteraciones más frecuentes son la glomerulonefritis y la tubulonefritis, mientras que la amiloidosis es un hallazgo ocasional (Costa *et al.*, 2003; Zatelli *et al.*, 2003). De las diversas formas descritas de glomerulonefritis, las formas proliferativas difusas membranosa y mesangial son las más frecuentes, estando presente en el 100% de los perros del estudio llevado a cabo por Costa *et al.* (2003). En dicho estudio el 78,2% de los perros presentaban nefritis intersticial y en el 91% se detectó antígeno de *Leishmania*.

Por último, la hipertensión sistémica puede estar presente en las fases iniciales de la enfermedad renal (Cortadellas *et al.*, 2006). En un estudio realizado en perros con IRC se observó que la hipertensión sistémica acelera la progresión del fallo renal e incrementa el riesgo de desarrollar síndrome urémico así como la mortalidad (Jacob *et al.*, 2003).

A pesar de no haberse encontrado una relación clara entre la Lcan y la **afección cardiorrespiratoria** (Alves *et al.*, 2010; Koutinas y Koutinas, 2014), se han descrito alteraciones en el ritmo cardíaco, poliarteritis necrotizante, granulomas y miocarditis no supurativa (Torrent *et al.*, 2005; López-Peña *et al.*, 2009). Alves *et al.* (2010) observaron infiltrados inflamatorios en corazón y pulmones en perros con leishmaniosis, y detectaron mediante citología la presencia de una baja carga de amastigotes en dichos órganos, aunque no hallaron signos de alteración cardíaca o pulmonar. En el estudio llevado a cabo por Cortadellas *et al.*, (2006) las alteraciones cardíacas fueron el hallazgo sistémico más frecuente a consecuencia de la hipertensión sistémica, estando la hipertrofia ventricular izquierda presente en el 91,4% de los perros hipertensos con leishmaniosis.

Las alteraciones respiratorias incluyen disnea, rinitis, descarga nasal mucocatarral, epistaxis, estertores respiratorios, siendo la más evidente la

neumonía intersticial crónica. En estados de inmunosupresión pueden observarse procesos inflamatorios bacterianos y fúngicos secundarios, y la neumonía adquiere un aspecto supurativo (Slappendel, 1988).

El **cuadro neurológico** es poco frecuente (Saridomichelakis, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2009). No obstante, la meningoencefalomielitis subyacente asociada con Lcan puede ser la responsable de varios signos neurológicos (convulsiones, dolor y rigidez de cuello, paraplegia) y suele ser consecuencia de meningitis granulomatosa y/o neutrofílica, granulomas en el sistema nervioso central, hemorragias medulares, vasculitis o infartos cerebrales (García-Alonso *et al.*, 1996; Viñuelas *et al.*, 2001 Font *et al.*, 2004; José-López *et al.*, 2012). El depósito intersticial e intravascular de IgG y antígenos de *Leishmania* encontrados en el plexo coroideo de animales infectados con *L. infantum* sugiere que las barreras de filtración sangre-líquido cefalorraquídeo y de los cuerpos ciliares están alteradas (García-Alonso *et al.*, 1996).

Mediante inmunohistoquímica se han hallado amastigotes de *L. infantum* en los nervios espinales, médula espinal, parénquima cerebral y plexo coroideo (Márquez, 2013), y más recientemente mediante qPCR en diferentes áreas cerebrales y cerebelo (Grano, 2014). En la mayoría de estos estudios se detectaron títulos elevados de anticuerpos anti-*Leishmania* en el líquido cefalorraquídeo.

2.4. DIAGNÓSTICO

Los objetivos por los que se realiza el diagnóstico de la infección por *L. infantum* son: 1) confirmar la enfermedad clínica y 2) detectar perros infectados clínicamente sanos que viven en zonas endémicas, para prevenir la transmisión de portadores subclínicos mediante transfusión de sangre, evitar la importación de perros infectados en zonas no endémicas y controlar

la respuesta al tratamiento (Solano-Gallego *et al.*, 2011). El diagnóstico de infección no es sinónimo de diagnóstico de enfermedad, ya que la mayoría de los perros infectados no desarrollan la enfermedad (Baneth *et al.*, 2008; Paradies *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Paradies *et al.*, 2012) y los resultados obtenidos difieren considerablemente entre perros infectados clínicamente sanos y enfermos (Noli y Saridomichelakis, 2014).

El diagnóstico de la Lcan es complejo, por la diversidad de signos clínicos, el amplio rango de alteraciones clinicopatológicas inespecíficas y las diferentes respuestas inmunitarias del perro frente a la infección (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Por ello es necesario el uso integrado de todos los resultados que deben incluir: datos epidemiológicos, signos clínicos compatibles, alteraciones clinicopatológicas, diagnóstico diferencial, así como el uso de más de una prueba diagnóstica específica para demostrar la infección (cultivo, citología, histopatología, inmunohistoquímica y técnicas moleculares) y la presencia de anticuerpos específicos IgG (serología) (Noli y Saridomichelakis, 2014).

Las técnicas diagnósticas actuales carecen de una sensibilidad y especificidad del 100% y es esencial conocer en qué se basan, cuáles son sus limitaciones y su interpretación adecuada. (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

2.4.1. Diagnóstico clínico

2.4.1.1. Cuadro clínico

La infección por *L. infantum* en perros susceptibles progresa durante un periodo de tiempo variable hacia un cuadro clínico que puede ser muy diverso (**Tabla VI**). Por lo tanto, no se pueden atribuir unos signos clínicos específicos a esta enfermedad. Esto es consecuencia de los numerosos mecanismos patogénicos existentes en la enfermedad, los diferentes

órganos afectados, así como de la individualidad de la respuesta inmunitaria desarrollada en el hospedador (Baneth *et al.*, 2008). El periodo de incubación puede oscilar entre tres meses y siete años tras la picadura de un flebotomo infectado (Koutinas y Koutinas, 2014).

Tabla VI. Porcentaje de aparición de signos clínicos presentes en perros con leishmaniosis por *L. infantum*.

Signos clínicos	Frecuencia (%)
Generales:	
• Linfadenomegalia generalizada	49-90
• Pérdida de peso	2-78
• Caquexia	3-48
• Astenia	8-33
• Palidez de membranas mucosas	10-58
• Esplenomegalia	10-56
• Poliuria y polidipsia	4-12
• Fiebre	4-36
• Vómitos	10
• Diarrea	13
Cutáneos:	
• Dermatitis exfoliativa no prurítica, con o sin alopecia	39,6-73,1
• Dermatitis erosiva-ulcerativa	15,3-40
• Dermatitis nodular	2-17
• Dermatitis papular	0-1,6
• Dermatitis pustular	2-13
• Hiperqueratosis nasal	0-27,5
• Hiperqueratosis plantar	0-31
• Onicogriposis	8-71,1
• Pioderma bacteriana	24
Oculares:	
• Blefaritis	12
• Queratoconjuntivitis (común o seca)	10-20
• Uveítis anterior	4-8
Epistaxis	6-10
Articulares	1-16
Atrofia muscular	25
Alteraciones vasculares (vasculitis, tromboembolismo arterial)	No cuantificado
Alteraciones neurológicas	No cuantificado

Información extraída de: Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Blavier *et al.*, 2001; Koutinas *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001c; Baneth *et al.*, 2008; Manna

et al., 2009; Shaw *et al.*, 2009; Noli y Saridomichelakis, 2014 y Saridomichelakis y Koutinas, 2014.

La linfadenomegalia periférica y las lesiones cutáneas, especialmente la dermatitis exfoliativa, deberían considerarse como las únicas manifestaciones clínicas presentes de manera consistente en al menos el 50% de los casos (Noli y Saridomichelakis, 2014). Las lesiones cutáneas constituyen el signo clínico principal por el cual los propietarios acuden a la clínica veterinaria (50,6-65,3% de los casos), el hallazgo más frecuentemente en la exploración física (67-89% de los casos) y puede ser la única manifestación presente en la Lcan (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Saridomichelakis y Koutinas, 2014).

Otros hallazgos clínicos incluyen la pérdida progresiva de peso y apetito, intolerancia al ejercicio, astenia, atrofia muscular (de los músculos temporales y generalizada), poliuria y polidipsia, esplenomegalia, vómitos y diarrea, lesiones oculares, artritis y cojeras (Solano-Gallego *et al.*, 2009). En estados muy avanzados el animal presenta caquexia y puede llegar a morir como consecuencia de la enfermedad renal.

En conclusión, y dada la enorme variabilidad de los signos clínicos citados, en zonas endémicas la observación de uno sólo de los signos clínicos señalados debería ser motivo suficiente para incluir la leishmaniosis en el diagnóstico diferencial (Miró y Molina, 2006).

2.4.1.2. Alteraciones clinicopatológicas

Los análisis de sangre son fundamentales, sobre todo en casos dudosos, y permiten conocer el estado general del animal y seguir la evolución clínica tras el tratamiento.

En la **Tabla VII** se recogen los hallazgos clinicopatológicos más frecuentes en la Lcan.

Tabla VII. Porcentaje de aparición de alteraciones clinicopatológicas en la Lcan.

Alteración clinicopatológica	Frecuencia (%)
Anemia	22-73
Leucocitosis	24
Neutrofilia	24
Linfopenia	44
Trombocitopenia	22-44
Hiperproteinemia	49-73
Hipoalbuminemia	28-68
Hiperglobulinemia	30-71
Reducción ratio albúmina/globulinas	63-76
Azotemia	12-24
Incremento de enzimas hepáticas	16-26
Proteinuria	46-72

Información extraída de (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Koutinas *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001c; Baneth *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2009).

El hemograma suele caracterizarse por la presencia de anemia normocítica, normocrómica y no regenerativa, leucocitosis o leucopenia y trombocitopenia (Foglia Manzillo *et al.*, 2013; Noli y Saridomichelakis, 2014). La anemia está presente en la mayoría de los perros con leishmaniosis debido a una insuficiencia renal crónica o reducción en la eritropoyesis, y en pocas ocasiones puede agravarse por pérdidas de sangre o la destrucción inmunomediada de glóbulos rojos (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999).

En una minoría de casos de Lcan se producen alteraciones en el perfil bioquímico hepato-renal, destacando la elevación de las enzimas hepáticas (como alanina aminotransferasa (ALT) o fosfatasa alcalina) y azotemia renal

(elevación de urea y creatinina) (Slappendel, 1988; Rallis *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2006a).

Las alteraciones del proteinograma son muy comunes en la Lcan, especialmente en los estadios II, III y IV, y consisten en hiperproteinemia sérica con hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, y por tanto inversión en el cociente albúmina/globulinas (A/G). Es frecuente observar gammapatía policlonal, mientras que la hiperglobulinemia beta policlonal es menos común (Slappendel, 1988; Rallis *et al.*, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2012).

En el urianálisis es frecuente hallar proteinuria glomerular persistente (cociente proteínas/creatinina urinaria (UPC \geq 0,5) considerada un factor de riesgo importante en el desarrollo de alteraciones renales (Palacio *et al.*, 1995; Pierantozzi *et al.*, 2013). El UPC es la técnica más empleada para cuantificar el nivel de proteinuria.

2.4.1.3. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial debería establecerse en animales enfermos que presenten un cuadro clínico compatible con Lcan y, sin embargo, los resultados de las pruebas diagnósticas sean dudosos o negativos.

Entre las enfermedades con las que más frecuentemente hay que realizar el diagnóstico diferencial destacan todas aquellas que cursen con lesiones cutáneas (enfermedades autoinmunes, endocrinopatías, dermatosis parasitarias como demodicosis, sarna sarcóptica, dermatofitosis y dermatitis por picadura de pulgas), neoplasias y otras enfermedades vectoriales, como ehrlichiosis, hepatozoonosis, rickettsiosis, enfermedad de Lyme y babesiosis (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Bourdeau *et al.*, 2014).

Muchas de estas enfermedades, a su vez, pueden presentarse como procesos concomitantes en perros con Lcan, asociados a la inmunosupresión

o a la transmisión vectorial, pudiendo agravar el cuadro clínico del animal (Mozos *et al.*, 1999; Cortese *et al.*, 2006; De Tommasi *et al.*, 2013; 2014). La enfermedad más frecuentemente asociada con la Lcan es la ehrlichiosis, observándose un daño tisular mayor y un incremento en el número de amastigotes de *Leishmania* detectados en piel de los perros coinfectados (Mekuzas *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2014; Bourdeau *et al.*, 2014).

2.4.2. Diagnóstico parasitológico

Es el método diagnóstico más fiable, ya que consiste en identificar el parásito en muestras del animal mediante visualización directa, por técnicas de biología molecular, o por xenodiagnóstico.

Son métodos que suelen tener una elevada especificidad, pero la sensibilidad está condicionada por factores como la toma y tipo de muestra, la fase de la enfermedad y la carga parasitaria (Saridomichelakis *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2009).

La detección del parásito se realiza a partir de biopsias o aspirados de lesiones cutáneas y órganos hematopoyéticos (MO, LN, hígado y bazo) (Alvar *et al.*, 2004; Saridomichelakis *et al.*, 2005).

2.4.2.1. Observación microscópica de *L. infantum* mediante citología

La citología es una prueba diagnóstica concluyente, simple y que se puede emplear en las clínicas veterinarias debido a su bajo coste, el poco instrumental que requiere, la rápida obtención de resultados y la elevada especificidad, especialmente en perros con signos clínicos (Saridomichelakis *et al.*, 2005; 2009).

Consiste en la observación microscópica directa de amastigotes de *Leishmania* en extensiones del material aspirado, principalmente LN, MO o

piel, teñidas mediante métodos metacromáticos convencionales (Giemsa, May-Grunwald, Diff-Quick). Los amastigotes se observan en el interior del citoplasma de monocitos, neutrófilos o principalmente macrófagos (**Fig. 10**) o libres, como cuerpos ovalados de 2-4 micras de diámetro (Maia y Campino, 2008). La sensibilidad de esta técnica depende de la experiencia del observador, la calidad del frotis, el número de campos visuales examinados y la carga parasitaria (Saridomichelakis *et al.*, 2005; Miró *et al.*, 2008). En perros con infección subclínica no se recomienda esta técnica por tener una baja sensibilidad (Otranto *et al.*, 2009).

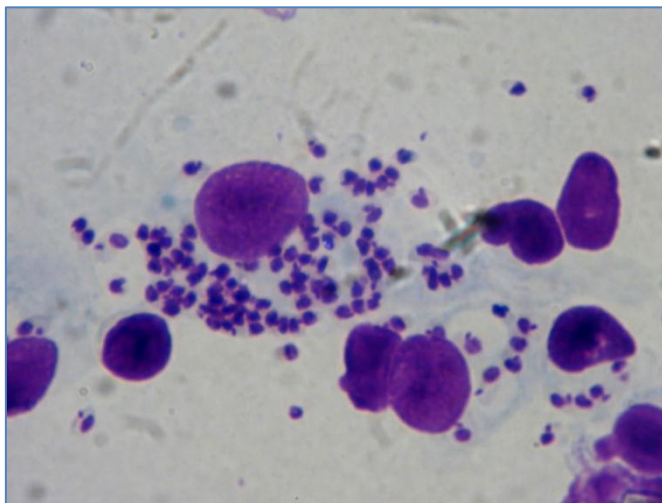


Figura 10. Citología de médula ósea en un perro con leishmaniosis clínica. Obsérvense dos macrófagos con numerosos amastigotes de *Leishmania* intracelulares. Tinción de Giemsa, 100x.

La muestra más empleada por los veterinarios clínicos para el diagnóstico microscópico es el aspirado de LN superficiales (Bourdeau *et al.*, 2014), y concretamente los LN poplíteos que constituyen la muestra más adecuada para la observación directa de amastigotes en animales con signos clínicos (Moreira *et al.*, 2007). Se trata de un procedimiento mínimamente invasivo y poco complejo (Noli y Saridomichelakis, 2014). Sin embargo, en

animales sin linfadenomegalia la obtención de dicha muestra puede ser difícil (Otranto *et al.*, 2009).

La sensibilidad de esta técnica en biopsias de MO no es muy elevada, (60-75%), aunque es superior a la del LN (30-50%) (Alvar *et al.*, 2004; Ferrer, 1999). Por el contrario, Saridomichelakis *et al.* (2005) describen una sensibilidad mayor en LN (92,6%) que en MO (88,2%), siendo ambas más elevadas en perros con cuadro clínico, y una especificidad del 100% en ambas. Mylonakis *et al.* (2005) hallaron amastigotes de *L. infantum* en aspirados de LN en el 96,9% de los perros enfermos y en el 25% en perros infectados clínicamente sanos.

La citología de piel debe considerarse únicamente cuando haya lesiones cutáneas de las que puedan tomarse muestras (p.e. úlceras, nódulos y pápulas) (Michalsky *et al.*, 2007; Lombardo *et al.*, 2014), ya que el análisis microscópico de los raspados cutáneos superficiales se ve dificultado por la presencia de artefactos en la muestra (Gramiccia, 2011).

2.4.2.2. Cultivo en medio específico

Existen medios de cultivo monofásicos como el Schneider's *Drosophila* o RPMI, comercialmente disponibles, pero poco efectivos para el aislamiento del parásito (Gramiccia, 2011). El medio de cultivo más idóneo es el NNN, no comercializado, consistente en una mezcla de agar-sangre de conejo al 15% con una fase líquida proveniente del agua de condensación originada al solidificarse el medio. Se inoculan 1 ó 2 gotas de la muestra biológica (aspirado o fragmento de órgano homogeneizado) en el medio específico y se incuba a una temperatura de 22°- 26°C. En los cultivos, las leishmanias pasan de la forma intracelular (amastigote) a la forma extracelular (promastigote). Los cultivos se observan semanalmente, pudiendo visualizarse los promastigotes a partir de la primera semana,

aunque pueden requerirse resiembras semanales en medio fresco para conseguir su aislamiento. Un cultivo se considera negativo si no se observan promastigotes tras cuatro pases sucesivos (Maia y Campino, 2008).

Esta técnica es ligeramente más sensible que la observación microscópica, especialmente cuando se emplea LN, MO y bazo (Maia *et al.*, 2009). En este último se han obtenido mejores resultados, con una sensibilidad de hasta el 97,9% (Barrouin-Melo *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2009; 2010). Sin embargo, la toma de muestra de bazo se evita ya que es un procedimiento mucho más invasivo que obtener aspirados de LN o MO. En el estudio llevado a cabo por Lombardo *et al.* (2014), únicamente el 33% de los perros resultaron positivos por cultivo de lesiones papulares, mientras que el 61,5% y el 93,3% fueron positivos mediante citología y qPCR, respectivamente, indicando una menor sensibilidad del cultivo respecto a las otras técnicas empleadas en dichas lesiones cutáneas.

A pesar de que esta técnica posee una especificidad del 100%, no se emplea de manera rutinaria debido a que es muy laboriosa, requiere mayor tiempo para obtener resultados y presenta riesgo de contaminación, ya que la toma de muestra se debe realizar asépticamente y la siembra en el medio de cultivo en condiciones de esterilidad. Principalmente se utiliza en investigación y estudios epidemiológicos que requieren el aislamiento del parásito para su posterior identificación isoenzimática (Maia y Campino, 2008; Miró *et al.*, 2008; de Almeida *et al.*, 2011; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

2.4.2.3. Aislamiento en animales de laboratorio

Esta técnica es de utilidad para obtener aislados de *Leishmania* de difícil crecimiento o a partir de inóculos contaminados. El modelo experimental más empleado es el criceto (*Mesocricetus auratus*) (Maia y Campino, 2008). El inóculo se puede inyectar por vía intraperitoneal, i.v.,

subcutánea (s.c.), i.d. e intracardiaca. La eutanasia se realiza a los 60 días p.i. para el aislamiento de los parásitos a partir de muestras de hígado o de bazo (Alvar *et al.*, 2004).

2.4.2.4. Xenodiagnóstico

Esta técnica se basa en detectar y aislar el patógeno a partir de flebotomos alimentados sobre el hospedador objeto de diagnóstico. Con fines experimentales, sirve para evaluar la infectividad de aislados de *Leishmania* o la capacidad infectante de perros enfermos tratados con diferentes fármacos (Molina *et al.*, 1994; 2001; 2006; Miró *et al.*, 2011a). El perro sospechoso, previamente sedado, se expone a la picadura del flebotomo durante una hora aproximadamente, con el fin de demostrar la presencia de promastigotes en el tubo digestivo de los flebotomos alimentados mantenidos en laboratorio mediante la observación microscópica o bien del ADN de *Leishmania* por técnicas moleculares (Molina *et al.*, 1994; Gramiccia, 2011).

En Europa se utilizan especies del género *Phlebotomus*, fundamentalmente, *P. perniciosus* (Bongiorno *et al.*, 2013; Ben Slimane *et al.*, 2014), mientras que en Sudamérica se ha empleado su vector natural *L. longipalpis* (Molina *et al.*, 1994; Travi *et al.*, 2001; Miró *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2014).

A pesar de la especificidad y sensibilidad indiscutible de este método, únicamente es aplicable en laboratorios altamente especializados que dispongan de un insectario con colonias de flebotomos bien establecidas (Maia y Campino, 2008).

2.4.2.5. Histopatología

Los amastigotes de *Leishmania* también pueden observarse en cortes histológicos de biopsias de piel o cualquier otro órgano infectado teñidos con hematoxilina y eosina. Aunque los amastigotes no se reconocen fácilmente (Roura *et al.*, 1999; Xavier *et al.*, 2006), puede sospecharse de una infección por *Leishmania* ante la presencia de una inflamación piogranulomatosa, granulomatosa o linfoplasmocitaria en el tejido observado (Petanides *et al.*, 2008; Koutinas y Koutinas, 2014), así como ante una hiperplasia reactiva de los LN (Lima *et al.*, 2004; Giunchetti *et al.*, 2008b; Lombardo *et al.*, 2014).

2.4.2.6. Inmunohistoquímica

Las técnicas de inmunohistoquímica, como la inmunoperoxidasa o la inmunofluorescencia directa de muestras tisulares, pueden ayudar a identificar o confirmar la presencia de parásitos, particularmente en órganos con baja carga parasitaria o cuando los parásitos no son identificables de forma clara mediante microscopía óptica (Maia y Campino, 2008). Se trata de un método mucho más sensible que la histología, especialmente en muestras de LN (Moreira *et al.*, 2007).

Al igual que las técnicas anteriores, requiere laboratorios e instalaciones especiales, de elevado coste, y personal cualificado para llevar a cabo tanto la técnica como la lectura de las preparaciones. Además, es probable la interpretación errónea dando lugar a resultados falsos positivos (los amastigotes pueden confundirse con artefactos) y a falsos negativos (la sensibilidad depende de la carga parasitaria) (Baneth y Aroch, 2008).

2.4.2.7. Diagnóstico molecular: Reacción en cadena de la polimerasa

La detección de ADN de *Leishmania* en tejidos mediante PCR permite un diagnóstico sensible y específico, detectando la infección antes que la seroconversión (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Coura-Vital *et al.*, 2011).

La técnica de PCR consiste en la amplificación *in vitro* de una secuencia específica de nucleótidos del ADN de *Leishmania* extraído a partir de muestras biológicas. Se emplean secuencias de oligonucleótidos (cebadores o *primers*) que se unen específicamente al ADN que flanquea una región de interés o secuencia diana, la cual es amplificada mediante una ADN-polimerasa termoestable. A partir de una molécula de ADN de doble cadena se obtienen aproximadamente 10^9 copias tras 30 ciclos de amplificación. El producto obtenido de la PCR puede entonces visualizarse mediante electroforesis en gel de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio o hibridación con sonda marcada.

Aunque existen diferentes genes diana (p.e. la subunidad pequeña del ARN ribosómico (SSUrRNA) y el espaciador interno transcrito 1 del ADN ribosómico (ITS1), generalmente se amplifican fragmentos de la secuencia minicircular del ADN del kinetoplasto (kDNA), que está presente en aproximadamente 10.000 copias por parásito, lo que incrementa notoriamente la sensibilidad de la técnica (Lachaud *et al.*, 2002b; Miró *et al.*, 2008). Al igual que otros protozoos del orden Kinetoplastida, *Leishmania* spp. posee una red compleja de moléculas de ADN circular concentrado (kDNA) en el interior de su única mitocondria. El kinetoplasto se encuentra dentro de la membrana mitocondrial y su ADN representa aproximadamente el 20% de todo el ADN del parásito. Está formado por una red de moléculas circulares, los maxicírculos, (30-50 copias/parásito), con 20-40 kilobases (kb) de longitud, y los minicírculos, (10.000-20.000 copias/parásito) de 1 kb de

longitud (Rodgers *et al.*, 1990). El elevado número de copias de minicírculos, que conforman el 95% de la estructura, y la existencia de una región muy conservada, de 120-200 pares de bases (pb), entre especies ha permitido su aplicación en el diagnóstico (Rodgers *et al.*, 1990).

La región variable del gen *SSUrRNA* presenta un bloque de secuencia conservado para todo el género *Leishmania* al mismo tiempo que presenta diferencias con otros organismos (Meredith *et al.*, 1993; Simpson *et al.*, 2002). Este gen se encuentra repetido aproximadamente 160 veces en el genoma de *Leishmania* (Van Eys *et al.*, 1992), lo que garantiza una elevada sensibilidad de la PCR.

2.4.2.7.1. Tipos de muestras:

Debido al tropismo variable del parásito por los diferentes tejidos, la sensibilidad de la técnica varía entre ellos (Maia y Campino, 2008) y no se ha alcanzado ningún consenso sobre cuál es la muestra de elección (Lombardo *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013).

Las muestras en las que se ha observado una mayor sensibilidad incluyen la MO, el LN, el bazo, la piel y la conjuntiva, mientras que la sensibilidad es menor en sangre, capa leucocitaria y orina (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Las muestras pueden obtenerse de forma más o menos invasiva:

a) Muestras invasivas

- Aspirados de **médula ósea**: La PCR de MO continúa siendo actualmente la técnica de referencia en el diagnóstico parasitológico de *L. infantum*, debido a su elevada sensibilidad y especificidad y a que puede llevarse a cabo en animales sin LN palpables (Maia y Campino, 2008; Maia *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Carvalho Ferreira *et al.*, 2014). La carga

parasitaria en esta muestra es mucho mayor que la encontrada en otros tejidos (Ferreira *et al.*, 2013), existiendo una correlación positiva con los signos clínicos.

- Aspirados de **linfonódulo**: junto con la MO supone la muestra de elección para confirmar la presencia del parásito debido a su elevada sensibilidad (Manna *et al.*, 2004; Miró *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2009), pudiendo alcanzar el 100% en animales con signos clínicos y el 95,65% en animales clínicamente sanos (Moreira *et al.*, 2007).
- **Bazo**: El bazo es un órgano diana para la multiplicación de *Leishmania*, por lo que posee una elevada sensibilidad, de hasta el 95% (Solcà *et al.*, 2014). Sin embargo, el aspirado de bazo no se emplea de manera rutinaria ya que es una técnica altamente invasiva y laboriosa. Solcà *et al.* (2014) encontraron una correlación positiva entre la carga parasitaria en bazo y el número de signos clínicos presentes en los perros.
- **Piel**: Diversos estudios en los que se ha llevado a cabo la PCR sobre lesiones cutáneas (p.e. pápulas) han encontrado entre un 65% y un 93,3% de perros positivos, con cargas parasitarias elevadas en algunas lesiones (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Lombardo *et al.*, 2014). Manna *et al.*, (2004) y Carvalho-Ferreira *et al.* (2014) describen una sensibilidad de la PCR superior al 95% sobre biopsias de piel, independientemente de la presencia de lesiones cutáneas. La biopsia de piel consiste en un procedimiento invasivo, relativamente doloroso, que requiere una manipulación aséptica y conlleva un sangrado posterior (Carvalho-Ferreira *et al.*, 2014).
- **Sangre**: Los resultados obtenidos mediante PCR en sangre son controvertidos y las sensibilidades descritas varían mucho entre estudios (55-100%) (Nunes *et al.*, 2007; Carvalho Ferreira *et al.*, 2014). Algunos problemas asociados al uso de sangre en el diagnóstico de Lcan son la presencia de inhibidores de PCR, variaciones en la parasitemia y baja

sensibilidad (Lachaud *et al.*, 2002a; Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2008). Sin embargo, otros estudios muestran buenos resultados (Fisa *et al.*, 2001; Manna *et al.*, 2004; de Paiva Cavalcanti *et al.*, 2009; Carvalho Ferreira *et al.*, 2014). Francino *et al.* (2006) sugieren que el diagnóstico de la infección puede realizarse mediante qPCR en sangre debido a que esta técnica puede detectar parasitemias extremadamente bajas.

b) Muestras no invasivas:

- **Hisopos de conjuntiva (HC):** han mostrado resultados muy prometedores en el diagnóstico molecular no invasivo de la Lcan, con una elevada sensibilidad (superior al 80%) (Strauss-Ayali *et al.*, 2004 ; Ferreira *et al.*, 2008; Pilatti *et al.*, 2009; Gramiccia *et al.*, 2010; Carvalho Ferreira *et al.*, 2014) y una especificidad del 100% (Strauss-Ayali *et al.*, 2004); incluso en animales seronegativos (Gramiccia *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2010; 2011) y en áreas no endémicas (Geisweid *et al.*, 2013). Tras la infección, las leishmanias pueden alcanzar la región ocular mediante diseminación hemática (Reithinger *et al.*, 2002a), pudiendo estar el tejido linfóide asociado a la conjuntiva infiltrado con histiocitos que albergan parásitos (Strauss-Ayali *et al.*, 2004). Martínez *et al.* (2011) proponen el HC como tejido de elección en perros con alteraciones oculares, y para el diagnóstico temprano de la infección, ya que se obtienen valores positivos antes que con la serología (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Quaresma *et al.*, 2009; Belinchón-Lorenzo *et al.*, 2013). Lombardo *et al.* (2012) y Geisweid *et al.* (2013) observaron una sensibilidad similar entre HC y LN, mientras que de Almeida Ferreira *et al.* (2012) mostraron una sensibilidad comparable entre HC y MO.

Recientemente se ha valorado la eficacia de la PCR de HC en el diagnóstico de la infección por *Leishmania* spp. en gatos de Brasil y

Grecia, resultando el 13,5% (Oliveira *et al.*, 2015) y 3,1% (Chatzis *et al.*, 2014) de los gatos positivos, respectivamente.

- **Hisopos de mucosa oral (HO):** La PCR de HO muestra una baja sensibilidad en los estudios realizados recientemente en Europa, tanto en perros enfermos como clínicamente sanos (Lombardo *et al.*, 2012; 2014; Solano-Gallego *et al.*, 2013). En contraposición, en un estudio realizado en Brasil encontraron una buena sensibilidad, posiblemente incrementada por la inclusión de perros con lesiones en la mucosa oral (Ferreira *et al.*, 2013). Las rutas a través de las cuales *Leishmania* puede alcanzar la cavidad oral incluyen el tejido linfoides tonsilar, las glándulas salivales, tejido periodontal, gingival u otros tejidos orales (Duncan *et al.*, 2007).
- **Hisopos de mucosa nasal y oído:** Ambos tejidos fueron analizados mediante PCR convencional directa (cPCR) y qPCR por Ferreira *et al.* (2013). Los hisopos de exudado ótico mostraron baja sensibilidad y carga parasitaria, así como un bajo rendimiento y pureza en el ADN extraído. Los hisopos de mucosa nasal mostraron un potencial elevado para el diagnóstico molecular cualitativo.
- **Pelo:** Se ha demostrado la presencia de kDNA de *L. infantum* en el pelaje de animales infectados (Belinchón-Lorenzo *et al.*, 2013; Muñoz-Madrid *et al.*, 2013). Se recomienda analizar al menos dos localizaciones (cabeza, tronco, extremidades o zona dorsolumbar). Según los autores, la presencia de *L. infantum* en el pelo podría deberse a su incorporación directa en las células foliculares, durante el proceso de queratinización, por la inflamación local/dermatitis, o bien mediante migración desde la corriente sanguínea (Belinchón-Lorenzo *et al.*, 2013).

- **Orina:** Se ha detectado la presencia de ADN de *L. infantum* en la orina de perros con infección natural (Franceschi *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007a; Manna *et al.*, 2008c), aunque con menor sensibilidad que la PCR de MO, LN y sangre. Mientras que Manna *et al.* (2008c) y Solano-Gallego *et al.* (2007a), encontraron una asociación entre perros con insuficiencia renal y la presencia de ADN en orina mediante qPCR, Franceschi *et al.* (2007), empleando cPCR, no observaron dicha asociación. No obstante, podría ser útil para valorar la carga parasitaria en perros tratados con insuficiencia renal y para monitorizar el daño renal (Solano-Gallego *et al.*, 2007a).

La eficacia de la técnica de PCR dependerá de una serie de factores entre los que se incluyen los cebadores empleados, número de copias de la secuencia diana, el método de extracción de ADN, el tipo de muestra biológica y el protocolo de la técnica PCR (Alvar *et al.*, 2004; Baneth y Aroch, 2008; Miró *et al.*, 2008).

2.4.2.7.2. Tipos de PCR

a) PCR convencional directa

El resultado de una cPCR es una variable discreta con dos posibles valores: positivo o negativo, e incluso muestras con diferencias en la carga parasitaria de hasta cinco órdenes de magnitud son positivas en la cPCR. Esta técnica presenta algunos inconvenientes como la necesidad de analizar mediante electroforesis los productos amplificados, y no permitir la cuantificación del ADN obtenido, viéndose reducida su utilidad cuando se requiere una monitorización precisa de la carga parasitaria. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el diagnóstico de la Lcan, aunque actualmente se está viendo reemplazada por la qPCR (Francino *et al.*, 2006).

b) PCR anidada

Es una variación de la cPCR en la que se emplean dos grupos de cebadores en dos reacciones de PCR sucesivas, estando la segunda reacción destinada a amplificar el producto obtenido en la primera reacción de PCR, reduciendo así la posible contaminación por uniones inespecíficas de los cebadores e incrementando la sensibilidad y la especificidad (Fisa *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2013).

c) PCR cuantitativa en tiempo real

La qPCR está reemplazando a la cPCR y la nPCR en el diagnóstico y seguimiento de muchas enfermedades, ya que realiza detecciones muy sensibles, rápidas, precisas y reproducibles de ADN específico presente en la muestra analizada (Francino *et al.*, 2006; de Moraes *et al.*, 2013; Carvalho Ferreira *et al.*, 2014). Los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, no requiriendo manipulación posterior, y por tanto, disminuyendo considerablemente el riesgo de contaminación.

Existen dos tipos de detección por fluorescencia: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

- Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia al unirse al ADN de doble hélice. El más empleado es SYBR *Green* I (de Paiva Cavalcanti *et al.*, 2009; Quaresma *et al.*, 2009; de Almeida Ferreira *et al.*, 2012). El incremento de ADN de cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Sus principales ventajas son la fácil optimización de las condiciones de la reacción y un menor coste respecto a las sondas específicas.

- Las sondas de hibridación específicas están marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la hibridación y la transferencia de energía fluorescente de sondas internas con el fragmento amplificado. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales. Las sondas más utilizadas son los cebadores fluorescentes o “*molecular beacons*” (Poot *et al.*, 2005), las sondas de hibridación o sondas FRET (Solano-Gallego *et al.*, 2007a) y las sondas de hidrólisis o Taqman®.

La metodología Taqman® proporciona una elevada sensibilidad y se está aplicando recientemente en el diagnóstico y seguimiento post-tratamiento de Lcan (Pennisi *et al.*, 2005b; Francino *et al.*, 2006; Dantas-Torres *et al.*, 2011; Belinchón-Lorenzo *et al.*, 2013; Tellevik *et al.*, 2014). (Fig. 11).

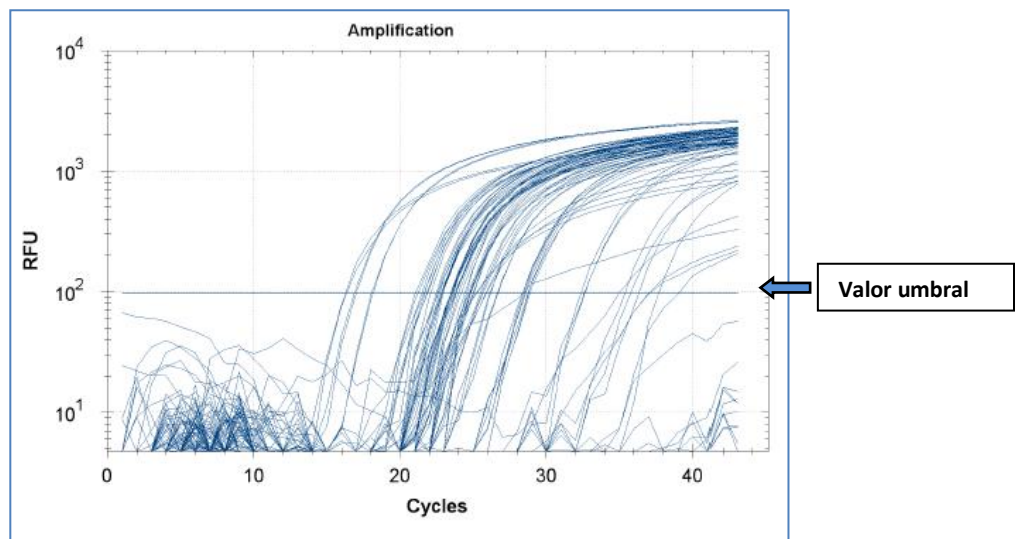


Figura 11. PCR en tiempo real con sonda Taqman. Curva para la cuantificación de *L. infantum* en escala logarítmica en la que se muestra el valor umbral determinado automáticamente por el software. RFU: Unidades de fluorescencia relativa.

Existen dos estrategias de cuantificación del ADN diana: 1) cuantificación absoluta: relaciona la señal obtenida con la qPCR a una curva de calibración externa o curva estándar (**Fig. 12**), obtenida mediante la amplificación paralela de una serie de concentraciones conocidas de una secuencia de ADN de referencia; y 2) cuantificación relativa: no requiere estándares con concentraciones determinadas. Compara los niveles de expresión de un gen en estudio con uno o más genes de referencia (*housekeeping*) (Manna *et al.*, 2009).

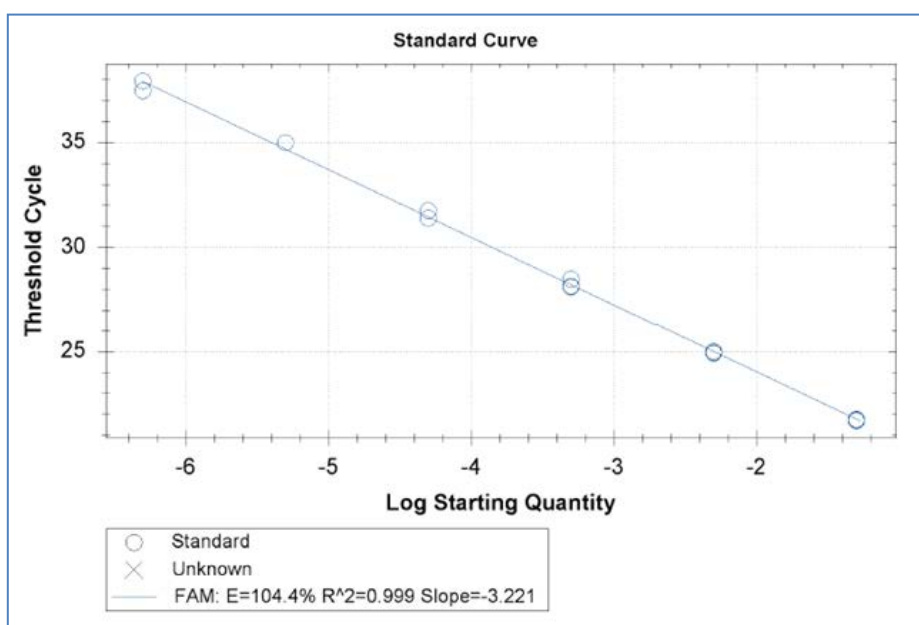


Figura 12. Curva estándar obtenida con qPCR de *L. infantum* y sonda Taqman.

2.4.3. Diagnóstico inmunológico

Las técnicas inmunológicas empleadas en el diagnóstico de la Lcan permiten valorar la respuesta inmunitaria humoral y celular.

2.4.3.1. Análisis de la respuesta inmunitaria humoral

El diagnóstico inmunológico de la Lcan se basa principalmente en la detección de IgG frente al parásito. La muestra más habitual para la detección de estos anticuerpos específicos anti-*Leishmania* es el suero, donde además sus concentraciones se correlacionan positivamente con el cuadro clínico y la parasitemia (Reis *et al.*, 2006c; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007a; Teixeira Neto *et al.*, 2010). Aunque se han empleado otras muestras menos invasivas, como la orina (Solano-Gallego *et al.*, 2003b; Todolí *et al.*, 2009) o el líquido cefalorraquídeo (Lima *et al.*, 2003) su sensibilidad es inferior a la del suero. La sensibilidad del diagnóstico serológico es muy elevada, debido a la respuesta inmune humoral exagerada (no protectora) en perros enfermos.

Algunos autores han estudiado el papel de otras inmunoglobulinas en el diagnóstico de Lcan, así como de las subclases IgG1 e IgG2, aunque, los resultados muestran divergencias entre estudios. Solano-Gallego *et al.* (2001c) hallaron una correlación positiva mayor entre las concentraciones de IgG2 y la presencia de cuadro clínico en comparación con IgG1. A su vez, de Freitas *et al.*, (2012) observaron que la presencia de enfermedad se correlaciona de forma positiva con IgG2 e IgM, de manera negativa con IgG totales, IgG1 e IgGA, y no se halló correlación con IgE.

Un nivel elevado de anticuerpos junto con un cuadro clínico compatible suele ser suficiente para establecer el diagnóstico definitivo de la Lcan (Solano-Gallego *et al.*, 2009). No obstante, la presencia de niveles bajos de anticuerpos puede observarse en perros con una respuesta celular específica, siendo necesario la realización de pruebas diagnósticas complementarias para confirmar o descartar enfermedad (Noli y Saridomichelakis, 2014) (**Fig. 14**).

Una de las mayores desventajas de las técnicas serológicas la constituyen las reacciones cruzadas frente a otros patógenos, que pueden reducir notablemente la especificidad, principalmente *Trypanosoma cruzi* en el sur de Estados Unidos (Petersen *et al.*, 2009) centro y sur de América, y otras especies de *Leishmania*, como *L. braziliensis*, *L. mexicana*, etc. (Ferreira *et al.*, 2007; Porrozzì *et al.*, 2007). Menos clara es la reacción cruzada con otros patógenos menos similares, como *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia conorii*, *Toxoplasma gondii*, *Babesia canis*, *Neospora caninum* y *Hepatozoon canis* (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

Existen diversas técnicas serológicas para el diagnóstico de la Lcan, las cuales se pueden dividir en cualitativas y cuantitativas:

- Técnicas serológicas cuantitativas: son apropiadas para el diagnóstico en la clínica veterinaria y el seguimiento del tratamiento, aunque debe llevarse a cabo en laboratorios especializados (Bourdeau *et al.*, 2014). La **Figura 13** recoge un árbol de decisiones a seguir partiendo del resultado obtenido mediante serología cuantitativa en el diagnóstico de Lcan.

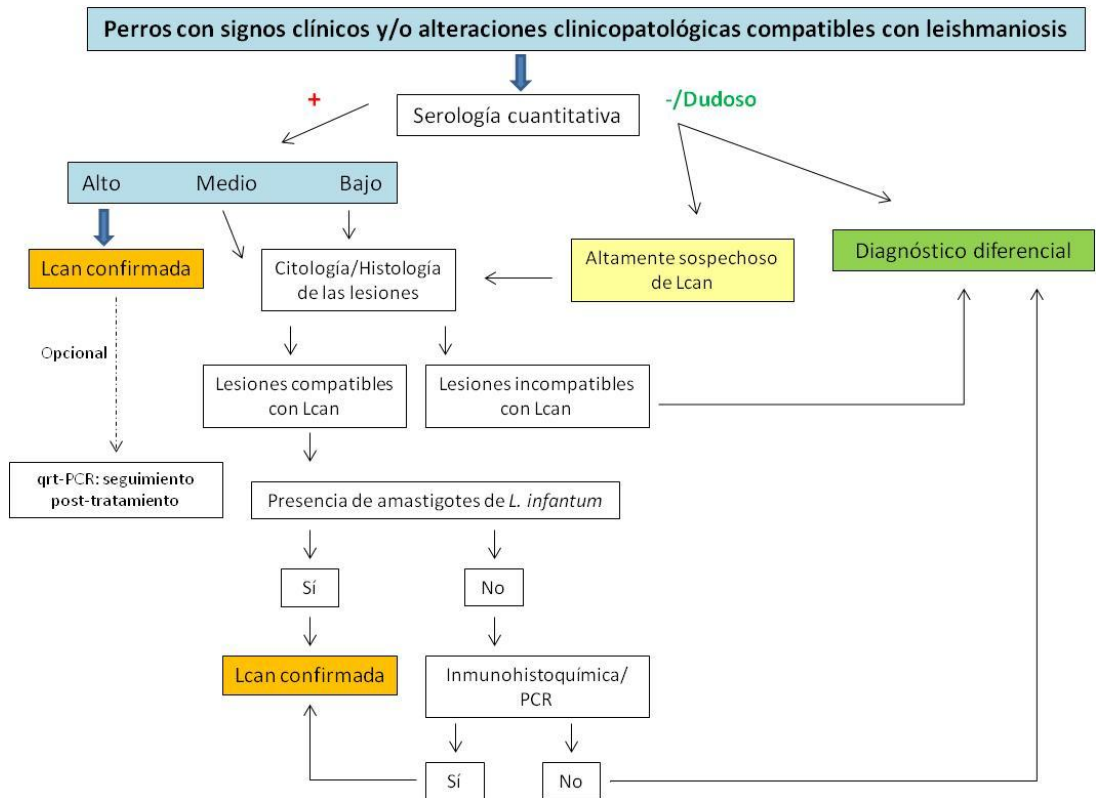


Figura 13. Algoritmo de diagnóstico en perros con signos clínicos y/o alteraciones clinicopatológicas compatibles con leishmaniosis. Extraído y adaptado de Solano-Gallego *et al.* (2009).

Destacan las siguientes técnicas:

- a) **Inmunofluorescencia indirecta (IFI):** Es la técnica diagnóstica más empleada de manera rutinaria por los veterinarios clínicos (Bourdeau *et al.*, 2014) y ha sido considerada tradicionalmente la técnica de referencia para el diagnóstico serológico de Lcan por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) debido a su alta sensibilidad y especificidad (Maia y Campino, 2008). Sus inconvenientes son la subjetividad de la lectura, la necesidad de emplear un microscopio de fluorescencia y la pérdida de sensibilidad en animales infectados clínicamente sanos (Mettler *et al.*, 2005). No obstante, tanto la metodología como la interpretación son bastante homogéneos,

permitiendo comparar los resultados obtenidos por diferentes laboratorios.

La técnica se basa en emplear como fuente antigénica una suspensión de promastigotes completos de *Leishmania* fijados en un portaobjetos de cristal al que se añaden diluciones seriadas del suero problema. La fijación de los anticuerpos específicos sobre el parásito se visualiza mediante un conjugado de anti-inmunoglobulinas caninas marcadas con isotiocianato de fluoresceína a través de un microscopio de fluorescencia (**Fig. 14**). No existe un acuerdo entre los laboratorios sobre el punto de corte de la técnica de IFI, el cual puede oscilar entre 1:40 y 1:320 (Gramiccia, 2011). En general, se consideran títulos elevados aquéllos que superen entre 2 y 4 veces el punto de corte indicado por el laboratorio de referencia (Paltrinieri *et al.*, 2010). En los casos dudosos, la fiabilidad del resultado aumenta si se realizan varias determinaciones con intervalos de 30-45 días, en los que se observará una seroconversión, o si se realizan dos técnicas diferentes (Ferrer *et al.*, 1995).

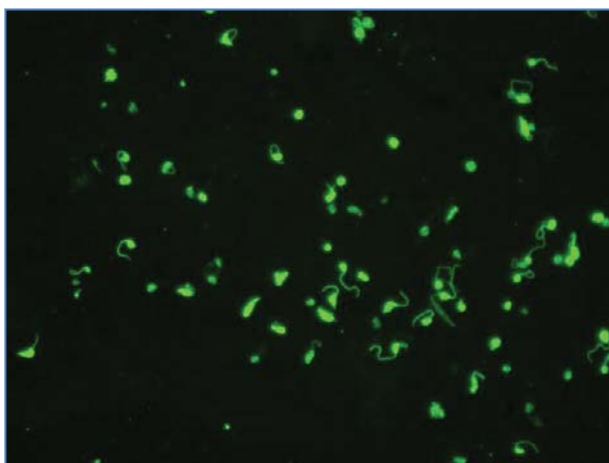


Figura 14. Promastigotes de *L. infantum* detectados mediante inmunofluorescencia indirecta.

b) ELISA (Enzimoimmunoensayo): es un test específico cuya sensibilidad es superior a la técnica de IFI (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2014). La sensibilidad y especificidad pueden oscilar entre 80 y 99,5% y entre 81 y 100%, respectivamente (Marcondes *et al.*, 2011a). Para la realización de esta técnica se han utilizado diversos antígenos que pueden clasificarse en cuatro grupos según su naturaleza: extractos de amastigotes solubles o completos, proteínas recombinantes y proteínas purificadas (Solano-Gallego *et al.*, 2014). La especificidad y sensibilidad se ven afectadas por el tipo de antígeno seleccionado (Mettler *et al.*, 2005; Maia y Campino, 2008). La sensibilidad puede mejorarse usando antígenos múltiples (Mancianti *et al.*, 1995) o amastigotes como fuente antigénica, en lugar de promastigotes, para la detección de anticuerpos tanto en perros enfermos como clínicamente sanos (Santarém *et al.*, 2010).

Uno de los antígenos más empleados es el antígeno recombinante rK39 de *L. chagasi*, que contiene una secuencia repetida de 39 aminoácidos y es un potente inmunógeno de linfocitos B, lo que ha sido aprovechado para desarrollar técnicas diagnósticas a partir de la forma recombinante del antígeno (rK39). Diversos estudios serológicos muestran su elevada sensibilidad en el diagnóstico de la Lcan (Mettler *et al.*, 2005; Otranto *et al.*, 2005; Porrozzini *et al.*, 2007), aunque la respuesta humoral en perros frente a este antígeno no es tan dominante como en humanos.

Sus principales ventajas son la automatización, lo que permite procesar un gran número de muestras simultáneamente, así como una lectura espectrofotométrica objetiva y, al igual que la técnica de IFI, permite cuantificar títulos de anticuerpos específicos.

Se han desarrollado diversas variantes del método clásico (ELISA competitivo, Dot-ELISA, FAST-ELISA) que son de gran utilidad

en los estudios de campo por su simplicidad, rapidez de ejecución y sensibilidad, y en los estudios epidemiológicos en áreas endémicas de Lcan.

- c) **Test de aglutinación directa (DAT):** Emplea promastigotes completos y teñidos, bien en suspensión o en forma liofilizada para la detección de la respuesta humoral frente a los antígenos de superficie de *Leishmania*. Es un método barato, relativamente simple y de fácil manejo, lo que lo hace útil en estudios de campo y en laboratorio (Meredith *et al.*, 1995; Cardoso *et al.*, 2004). Su sensibilidad es de 93-97,7% y su especificidad del 95% (Schallig *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2007). Una de las limitaciones de esta técnica es el periodo de incubación relativamente largo (18 horas) y la necesidad de realizar diluciones seriadas de suero.

Una variante del DAT es el test de aglutinación rápida de cribado (FAST), que combina una concentración mayor de parásito con un volumen de ensayo menor, por lo que requiere una única dilución de la muestra y una lectura en menor tiempo (3 horas), siendo muy útil para estudiar poblaciones grandes de perros (Schallig *et al.*, 2002). Se han obtenido sensibilidades y especificidades de 93,6-97,7% y 89-93% (Schallig *et al.*, 2002; 2004).

- d) **Inmunoblotting:** detecta anticuerpos frente a fracciones antigénicas específicas del parásito. Se ha empleado para evaluar la fase de la infección en la que se encuentra el animal y la respuesta al tratamiento (Fernández-Pérez *et al.*, 1999; Lasri *et al.*, 2003). Posee una sensibilidad superior a la de la técnica de IFI y es capaz de discriminar fases tempranas de la enfermedad en animales con resultados negativos mediante IFI y ELISA (Aisa *et al.*, 1998; Fernández-Pérez *et al.*, 1999). Sin embargo, no se realiza rutinariamente en el diagnóstico de la Lcan ya que requiere personal

especializado y un laboratorio de investigación, siendo su aplicación principal validar otras técnicas (Ferroglia *et al.*, 2007).

e) Citometría de flujo: es una técnica rápida y precisa que permite cuantificar, examinar y clasificar partículas microscópicas suspendidas en una corriente de fluido, como IgG frente a promastigotes de *Leishmania* (Maia y Campino, 2008). Posee una sensibilidad (95-100%) y especificidad (100%) altas (Andrade *et al.*, 2009; Ker *et al.*, 2013) y ha demostrado su utilidad en el diagnóstico de animales vacunados, infectados y no infectados.

- Técnicas serológicas cualitativas: existen diversos análisis inmunocromatográficos o *dipsticks* y cada uno difiere en el antígeno y reactivo empleado (Paltrinieri *et al.*, 2010). Fundamentalmente se basan en el antígeno rK39, disponible en el mercado en la forma de tiras de papel de nitrocelulosa impregnadas del antígeno (Mettler *et al.*, 2005; Otranto *et al.*, 2005). Dichos kits son fáciles de usar y rápidos, lo que permite una actuación inmediata del veterinario, siendo muy útiles en estudios de campo. El 37% de los veterinarios lo utilizan de manera rutinaria (Bourdeau *et al.*, 2014). A pesar de presentar una especificidad media-alta, su sensibilidad oscila entre 30-70% (Reithinger *et al.*, 2002b; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2014), lo que incrementa el número de resultados falsos negativos al ser incapaces de detectar perros con niveles bajos de anticuerpos, por lo que en casos sospechosos con resultados negativos debería realizarse un método serológico cuantitativo (Solano-Gallego *et al.*, 2011). En cambio, algunos autores encuentran una sensibilidad alta (94,7% y 97,06%) con algunos de estos kits comerciales, como es el caso del SNAP® Canine Leishmania Antibody Test Kit (IDDEX) y el rK39 dipstick, respectivamente (Marcondes *et al.*, 2011a).

Recientemente, se ha recomendado el empleo de Speed Leish K® (Virbac, Francia), un test cualitativo rápido, para realizar cribados frente a *L. infantum* previa vacunación con CaniLeish® (Virbac, Francia). Los fabricantes recomiendan vacunar únicamente aquellos perros con resultados negativos en Speed Leish K®, ya que la eficacia de la vacuna ha sido evaluada exclusivamente en perros libres de infección por *L. infantum*. Solano-Gallego *et al.* (2014) observaron una sensibilidad baja (63,6%) con este test, y proponen otros métodos más sensibles para decidir qué perros pueden ser vacunados. Por el contrario, Ferroglio *et al.* (2013) obtienen una sensibilidad del 96,3% con Speed Leish K®, en relación a la técnica de IFI.

2.4.3.2. Análisis de la respuesta inmunitaria celular

La respuesta inmunitaria celular específica frente a *Leishmania* en perros es un indicador crucial de una respuesta protectora Th1 (Fernández-Bellón *et al.*, 2005; Paltrinieri *et al.*, 2010). De momento estas técnicas están poco estandarizadas y sólo son aplicables en investigación.

Las principales pruebas de estudio de la inmunidad celular se pueden dividir en métodos *in vivo* (test de hipersensibilidad retardada) y métodos *ex vivo* (estudio de linfoproliferación y detección de IFN- γ).

- Test de hipersensibilidad retardada o Test de Montenegro: (*Leishmanin Skin Test* o *Delayed Hipersensitivity Test* –DTH) se basa en la inoculación intradérmica de una solución salina-fenolada de promastigotes inactivados, denominada leishmanina, y la posterior lectura a las 48-72 horas. Los perros que presenten un resultado positivo mediante la formación de un nódulo o induración de diámetro mayor o igual a 5 mm se consideran resistentes y con una respuesta inmunitaria celular activa (Pinelli *et al.*, 1994; Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2001b). En

general, el resultado es negativo durante la infección activa, mientras que es positivo durante la infección subclínica, en fases tempranas de leishmaniosis visceral o tras un tratamiento eficaz (Maia y Campino, 2008). Los perros de la raza Podenco Ibicenco, autóctonos de una zona endémica de leishmaniosis, se consideran resistentes a la infección por *L. infantum*, ya que presentan un alto porcentaje de resultados positivos mediante esta prueba (Solano-Gallego *et al.*, 2000; 2005). Esta técnica es sencilla y barata, sin embargo, el intervalo de 2-3 días hasta poder realizar la lectura y la posibilidad de obtener resultados falsos positivos tras inoculaciones repetidas, limitan su utilidad (Fernández-Bellon *et al.*, 2005).

- Estudio de linfoproliferación: (Lymphocyte proliferation assay -LPA) esta técnica permite evaluar la respuesta celular *in vitro*. Consiste en el cultivo de linfocitos, principalmente de sangre periférica, con antígenos del parásito para valorar su capacidad blastogénica y se añade un mitógeno inespecífico para valorar la inmunocompetencia del individuo. Las células no estimuladas también se cultivan como controles negativos. La proliferación celular se expresa como un índice de estimulación (células estimuladas/células no estimuladas), considerándose positivos valores superiores a 2 (Fernández-Bellon *et al.*, 2005) ó 3 (Santos-Gomes *et al.*, 2003). Los perros resistentes y sin signos clínicos presentan una respuesta proliferativa fuerte a los antígenos de *Leishmania*, mientras que los perros susceptibles fracasan en responder *in vitro* a la linfoproliferación (Abranches *et al.*, 1991; Quinnell *et al.*, 2001). Se trata de una técnica laboriosa, que requiere equipamiento especializado y es poco sensible (60-75%) y específica (83%) (Quinnell *et al.*, 2001). La respuesta linfoproliferativa específica no sólo depende de la gravedad de

la enfermedad, sino también de la genética y el estatus inmunológico del hospedador (Maia y Campino, 2008).

- Cuantificación del interferón gamma: (IFN- γ *cytopathic effect inhibition bioassay*) este método detecta el IFN- γ , la citoquina más importante involucrada en la respuesta celular frente al parásito, producido por linfocitos circulantes estimulados con el antígeno de *Leishmania* en sobrenadantes cultivados. Este bioensayo valora la protección que el IFN- γ infiere a una monocapa de células renales caninas infectadas con el virus de la estomatitis vesicular (Fernández-Bellon *et al.*, 2005). El IFN- γ representa un buen marcador para predecir recaídas de la enfermedad en perros infectados y para determinar la eficacia del tratamiento (Manna *et al.*, 2008b; Andrade *et al.*, 2011). Las grandes desventajas de esta técnica son que es muy laboriosa y que emplea un virus altamente patógeno.

2.5. CONTROL

El control de esta enfermedad se realiza mediante un diagnóstico precoz, el tratamiento de los perros infectados, el desarrollo de nuevas moléculas terapéuticas, la aplicación de vacunas, y la lucha antivectorial.

Las acciones a incluir en el control de la Lcan se pueden resumir como:

- Actuaciones sobre el reservorio, mediante el uso de quimioterapia o vacunas. Es de vital importancia diagnosticar los perros infectados clínicamente sanos, así como comenzar el tratamiento en las fases iniciales de la enfermedad y hacer un seguimiento de eficacia del mismo (Courtenay *et al.*, 2002).

- Actuaciones dirigidas hacia el vector adulto, rociando superficies con insecticidas residuales.
- Evitar la picadura de los flebotomos para interrumpir la transmisión.

2.5.1. Tratamiento

A pesar de existir varias opciones terapéuticas disponibles, hasta el momento no existen principios activos totalmente eficaces frente a la Lcan. La mayoría de los fármacos mejoran el cuadro clínico de los perros tratados, pero son incapaces de eliminar completamente el parásito y no evitan las recidivas (Noli y Auxilia, 2005).

La finalidad del tratamiento no es sólo incrementar la esperanza de vida, mejorar la calidad de vida, restaurar una respuesta inmune eficaz y evitar recidivas clínicas, sino también disminuir la carga parasitaria, reduciendo de esta manera su poder infectante para los flebotomos (Oliva *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2011a; Otranto y Dantas-Torres, 2013).

La respuesta clínica al tratamiento puede variar dependiendo del estado clínico inicial y de la respuesta específica al tratamiento de cada animal (Miró *et al.*, 2014).

2.5.1.1. Principios activos

Mientras que los protocolos de tratamiento han cambiado considerablemente, los fármacos de primera elección para tratar Lcan siguen siendo los antimoniales, empleados durante más de 90 años (Baneth y Shaw, 2002). Los fármacos nuevos que han sido investigados, básicamente se han propuesto como complementarios a los ya existentes de primera línea, o bien como terapia de segunda línea para perros que no responden bien o en los que no se pueden emplear los tratamientos convencionales.

- **Antimoniales pentavalentes**

Las sales de antimonio se han utilizado durante décadas en el tratamiento de Lcan. Inicialmente se comercializaban en la forma trivalente, pero debido a su elevada toxicidad, se pasaron a utilizar los antimoniales pentavalentes, los cuales continúan siendo los fármacos de primera elección. Existen dos formulaciones comerciales: Glucantime[®] (antimoniato de n-metilglucamina) en América Latina y el Sur de Europa, y Pentostam[®] (estibogluconato sódico) en países anglosajones. Ambos compuestos son muy parecidos en eficacia y toxicidad. Su mecanismo de acción no se conoce completamente pero se cree que su actividad leishmanicida se debe a la inhibición selectiva de las enzimas fosfofructoquinasa y piruvato deshidrogenasa de *Leishmania* implicadas en la glicólisis y la oxidación de los ácidos grasos, bloqueando la formación de trifosfato de adenosina (ATP) y trifosfato de guanosina (GTP) (Berman *et al.*, 1985). La disminución de estos nucleótidos en las células de los mamíferos es mucho menor, lo que hace suponer que los antimoniales pentavalentes tienen una toxicidad superior frente a *Leishmania* que frente a estas células y, por tanto, una cierta especificidad (Berman *et al.*, 1985). Además, los antimoniales pentavalentes incrementan la capacidad fagocítica de los monocitos y los neutrófilos (Denerolle y Bourdoiseau, 1999; Ikeda-Garcia *et al.*, 2007; Muniz-Junqueira y de Paula-Coelho, 2008).

Poseen una vida media corta en perros, eliminándose el 80-95% rápidamente a través de los riñones, principalmente por filtración glomerular, entre las 6-9 horas posteriores a su administración (Tassi *et al.*, 1994; Valladares *et al.*, 1996). Por ello, se recomienda una segunda dosis diaria para mantener una concentración inhibidora del fármaco durante la mayor parte del día (Valladares *et al.*, 1998).

En cuanto a la vía de administración, se ha demostrado una buena disponibilidad y una mayor permanencia de niveles séricos del antimonial en el organismo mediante las vías i.m. y s.c. que a través de la vía i.v. (Belloli *et al.*, 1995; Valladares *et al.*, 1996), por lo que se recomienda la administración s.c., ya que produce una menor irritación en el punto de inoculación y menos efectos adversos locales.

Tras un periodo de una o varias semanas del inicio del tratamiento se puede observar una mejoría tanto clínica, como en los valores hematológicos y bioquímicos. Sin embargo, los parásitos continúan detectándose en animales clínicamente curados (Oliva *et al.*, 1998; Riera *et al.*, 1999; Ikeda-Garcia *et al.*, 2007), aunque con una carga mucho menor (Manna *et al.*, 2008d). Las recidivas ocurren comúnmente tras un periodo de varios meses a 1-2 años post-tratamiento, especialmente cuando la duración del tratamiento es inferior a las cuatro semanas (Oliva *et al.*, 2010).

Actualmente, la pauta de administración recomendada es 75-100 mg/kg por vía s.c., de forma que se reparte la dosis total diaria dos veces durante 4-6 semanas, considerándose la primera línea de tratamiento cuando se combina con alopurinol (10 mg/kg v.o. dos veces al día durante 6-12 meses) (Solano-Gallego *et al.*, 2011). En el estudio llevado a cabo por Bourdeau *et al.* (2014) en el que encuestaron a más de 12.000 clínicas veterinarias del suroeste de Europa, mostraron que el tratamiento de elección fueron los antimoniales, comúnmente asociados con alopurinol, con pautas de administración variables entre países.

La toxicidad causada por los antimoniales es debida a la unión a grupos sulfhidrilo (-SH) y la alteración de la estructura terciaria de las proteínas y de los lugares de acción de numerosas enzimas, dando lugar a la aparición de signos de estibointolerancia (manifiestos tras las primeras

administraciones y remiten al suspender el tratamiento) o estibotoxicidad (manifiestos al final del tratamiento). Estos signos se pueden manifestar en forma de vómitos, diarrea, anorexia, fiebre, apatía, dolor en el punto de inoculación (Slappendel y Teske, 1997; Denerolle y Bourdoiseau, 1999; Bourdeau *et al.*, 2014) y nefrotoxicidad (Bianciardi *et al.*, 2009). En este último estudio todos los perros tratados con Glucantime[®] mostraron cambios morfológicos consistentes en daño tubular grave, a pesar de no mostrar ningún signo clínico de enfermedad renal.

Para evitar la formación de celulitis y fibrosis producidas en el punto de aplicación se recomienda la rotación del lugar de las inyecciones y evitar las zonas con abundante grasa subcutánea. Durante el tratamiento con Glucantime[®] pueden aparecer efectos colaterales en el punto de inoculación, como formación de tumefacción local, fibrosis o hemorragias diseminadas (Slappendel y Teske, 1997), por lo que se recomienda, además de la rotación de las inyecciones, en perros grandes repartir la dosis total en varios puntos de inoculación para reducir el volumen inoculado.

En la literatura se ha descrito una asociación entre el tratamiento con antimoniales y pancreatitis (Moritz *et al.*, 1998; Aste *et al.*, 2005; Luciani *et al.*, 2013). De dichos estudios, únicamente el llevado a cabo por Aste *et al.* (2005), en un solo perro, demuestra la presencia de pancreatitis midiendo la concentración de lipasa pancreática canina, el método diagnóstico más específico y sensible para diagnosticar pancreatitis en perros. A su vez, Xenoulis *et al.* (2014) demostraron que ninguno de los 20 perros tratados con la combinación de Glucantime[®] y alopurinol, presentó signos clínicos de pancreatitis ni aumentos de la lipasa pancreática canina por encima del valor fisiológico.

También se ha descrito la ausencia de cardiotoxicidad de los antimoniales, mediante la medición de la concentración de la troponina cardíaca sérica (Xenoulis *et al.*, 2014).

La combinación de Glucantime® y alopurinol posee una acción sinérgica, observándose una mayor eficacia, permitiendo administrar dosis inferiores y durante menos tiempo, lo que favorece la tasa de curaciones y que las recaídas ocurran más tarde y espaciadas (Baneth y Shaw, 2002; Noli y Auxilia, 2005; Manna *et al.*, 2015). En el estudio de seis años de duración llevado a cabo por Manna *et al.* (2015), en los nueve perros tratados con esta combinación se produjo una mejoría clínica y una reducción significativa de la carga parasitaria en LN a los 30 días post-tratamiento, y tan sólo se observó una recidiva en un perro tratado con esta combinación, a los 12 meses post-tratamiento.

Además, se consigue disminuir la presencia del parásito en la piel, reduciendo así el poder infectante de los perros a los flebotomos (Alvar *et al.*, 1994; João *et al.*, 2006; Miró *et al.*, 2011a). En perros tratados únicamente con Glucantime® también se ha observado mediante xenodiagnóstico un porcentaje muy reducido de flebotomos infectados (Gradoni *et al.*, 1987; Guarga *et al.*, 2002). A su vez, Ribeiro *et al.* (2008) detectaron una elevada reducción de la capacidad infectante de los perros sobre *L. longipalpis*, cinco meses tras el tratamiento con una formulación liposomada de antimoniato de n-metilglucamina.

Diversos autores han estudiado la formulación liposomal de antimoniales como terapia de la Lcan (Oliva *et al.*, 1995; Valladares *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2008). Sus principales ventajas son su mayor eficacia, la liberación lenta del fármaco de los liposomas y su menor toxicidad. La pauta de administración de 4 dosis de 6,5 mg/kg (vía i.v.) con intervalos de 4 días,

consiguió mejorar el cuadro clínico y reducir la carga parasitaria, aunque 6 meses post-tratamiento todos los perros continuaban albergando parásitos en MO (Ribeiro *et al.*, 2008). Con el fin de mejorar la eficacia, da Silva *et al.* (2012) incrementaron a 6 las dosis y la combinaron con alopurinol. De esta forma la carga parasitaria en MO y bazo se redujo significativamente a los 200 días post-tratamiento, y todos los animales resultaron negativos en la qPCR de hígado. Sin embargo, a pesar de los resultados prometedores en diversos estudios, ninguna formulación liposomal de este fármaco ha sido comercializada hasta la fecha. En parte, debido a la dificultad técnica a la hora de preparar una composición liposomal estable para sustancias solubles en agua, así como a su administración (i.v.) y los efectos adversos ocurridos durante los 15 primeros minutos de la administración de cada dosis (postración, defecación, taquipnea y sialorrea) (Ribeiro *et al.*, 2008).

La administración repetida de antimoniales pentavalentes en los perros en los que se producen recidivas ha provocado la selección de organismos menos susceptibles o resistentes a estos productos (Gramiccia *et al.*, 1992; Croft *et al.*, 2006).

- Alquilfosfolípidos

Los alquilfosfolípidos son análogos sintéticos de la lisofosfocolina.

- **Miltefosina**

La miltefosina es una alquilfosfocolina, perteneciente al grupo de los alquilfosfolípidos, que son análogos sintéticos de la lisofosfocolina. Originariamente se desarrolló como agente antineoplásico (Hilgard *et al.*, 1993), el cual demostró capacidad parasitocida *in vitro* e *in vivo* tanto frente a los promastigotes como a los amastigotes de varias especies de *Leishmania* (Croft *et al.*, 1996; Sundar *et al.*, 1998; Farca *et al.*, 2012).

La miltefosina posee una vida media de eliminación larga en perros (6,7 días), lo que conlleva una gran acumulación del fármaco en plasma tras la administración oral diaria repetida (Woerly *et al.*, 2009). En perros, la capacidad metabólica para transformar la miltefosina en metabolitos diferentes es baja y no existe una primera fase de metabolización en el hígado (Bianciardi *et al.*, 2009).

Los mecanismos de acción antitumoral y leishmanicida de la miltefosina no son del todo conocidos. Una hipótesis se basa en que la miltefosina se incorpora a la bicapa lipídica de la membrana plasmática del parásito, por sus características anfipáticas, aumentando la permeabilidad y alterando el metabolismo de los alquil-lípidos (Lux *et al.*, 2000). Otra hipótesis sugiere que provoca alteraciones de la membrana flagelar de los promastigotes y defectos en la síntesis de fosfolípidos (Santa-Rita *et al.*, 2000). En cualquier caso, termina produciendo la muerte celular por apoptosis (Paris *et al.*, 2004).

Además, la miltefosina estimula la actividad de los LT y de los macrófagos y la producción de compuestos de nitrógeno y oxígeno reactivos con una clara actividad parasitocida (Soto *et al.*, 2007). Algunos autores describen una respuesta inmune Th1 predominante durante el tratamiento, con un aumento en los niveles de IFN- γ y una reducción de los niveles de IL-4 (Manna *et al.*, 2008b; Andrade *et al.*, 2011).

La miltefosina empleada en el tratamiento de la LV humana induce una curación clínica y parasitológica rápida en más del 90% de los pacientes, con una dosis de 2,5 mg/kg durante 28 días (Sundar y Chatterjee, 2006).

Cuando se utiliza como monoterapia en perros, a pesar de poseer una eficacia clínica buena y reducir notablemente la carga parasitaria (Mateo *et al.*, 2009), se ha observado en algunos casos un incremento significativo

en la carga parasitaria 6 meses tras al tratamiento (Manna *et al.*, 2008a; Mateo *et al.*, 2009). En otro estudio, los perros tratados con miltefosina resultaron positivos mediante qPCR en MO a los 24 meses post-tratamiento (Andrade *et al.*, 2011).

Los efectos adversos de la miltefosina incluyen disorexia, vómitos y diarreas leves y autolimitantes (Woerly *et al.*, 2009; Miró, 2013a). Debido a su baja nefrotoxicidad, la miltefosina se ha recomendado para tratar perros con leishmaniosis e IRC, en lugar de los antimoniales (Bianciardi *et al.*, 2009). De hecho, en el estudio llevado a cabo por Miró *et al.* (2009) con perros con niveles elevados de creatinina, urea y ratio UPC, toleraron el tratamiento con miltefosina a la dosis recomendada y no mostraron empeoramiento de estos parámetros.

Se han descrito efectos teratogénicos, embriotóxicos y fetotóxicos en ratones (Sindermann y Engel, 2006), por lo que está contraindicado su empleo tanto en mujeres embarazadas, como en perras gestantes y/o lactantes.

Actualmente se considera la combinación de miltefosina (Milteforán®) con alopurinol la segunda elección para el tratamiento de la Lcan (Noli y Saridomichelakis, 2014) y ha demostrado ser tan eficaz clínicamente como el protocolo estándar basado en el tratamiento con antimoniales y alopurinol (Miró *et al.*, 2009). Miró *et al.* (2009) no observaron ninguna recidiva ni efectos adversos graves durante los 7 meses post-tratamiento y se produjo una reducción significativa de las puntuaciones clínicas y la carga parasitaria tanto en los perros tratados con miltefosina como en los tratados con Glucantime®, sin encontrarse diferencias significativas. Con esta combinación se disminuye el riesgo de recidivas y se ha demostrado ser más eficaz *in vitro* que la miltefosina por sí

sola (Farca *et al.*, 2012). No obstante, en un estudio reciente de 6 años de duración se ha observado una mayor tasa de recidivas en animales tratados con combinación de miltefosina y alopurinol que con la combinación de antimoniales y alopurinol, con cuatro perros (n=9) que sufrieron recidivas a los 6, 24 y 48 meses post-tratamiento y un perro (n=9) que sufrió recidivas a los 12 meses post-tratamiento, respectivamente (Manna *et al.*, 2015).

- **Oleilfosfocolina**

La oleilfosfocolina (OIPC) pertenece al grupo químico de las alquilfosfocolinas y es un análogo estructural de la miltefosina. Posee actividad leishmanicida frente a un amplio número de especies de *Leishmania* (Fortin *et al.*, 2014) tanto *in vitro* como en modelos animales experimentales (Fortin *et al.*, 2012).

Aunque la OIPC y la miltefosina presentan una actividad *in vitro* leishmanicida similar (Fortin *et al.*, 2012), según los dos estudios realizados con *L. infantum* en cricetos (Fortin *et al.*, 2012) y *L. major* en ratones BALB/c (Fortin *et al.*, 2014), la OIPC tiene una eficacia *in vivo* mayor para reducir la carga parasitaria de los órganos diana (bazo, hígado y MO) tras la administración oral, tanto en dosis única, como en dosis múltiples (Fortin *et al.*, 2012) y un perfil de seguridad mayor que la miltefosina.

Se elimina más rápidamente que la miltefosina, lo que puede ser beneficioso desde el punto de vista de selección de cepas resistentes al fármaco (Fortin *et al.*, 2012).

Recientemente se ha investigado en ratones la administración intradérmica de una formulación de OIPC en liposomas a través de un dispositivo de tatuaje para tratar lesiones cutáneas producidas por *L. major* y

L. mexicana (Shio *et al.*, 2014). El tratamiento presentó buena eficacia parasitológica así como una remisión rápida de las lesiones.

Las ventajas que presenta esta molécula en el tratamiento de la leishmaniosis son su biodisponibilidad oral, su bajo coste, amplio margen de seguridad y gran eficacia clínica y parasitológica (Miró, 2013a).

- Anfotericina B

La anfotericina B (AmB) es un antibiótico derivado de los polienos obtenido a partir del actinomiceto *Streptomyces nodosus* (Dutcher *et al.*, 1956). Es muy poco soluble y tradicionalmente se ha empleado como antifúngico, pero también se ha demostrado su actividad frente a algunas especies de protozoos como *Leishmania* y *Naegleria* (Baneth y Shaw, 2002). Su mecanismo de acción se basa en provocar la permeabilización de la membrana plasmática del parásito por interacción selectiva con el ergosterol presente en la misma (ausente en las células de mamíferos), formando poros acuosos que favorecen la pérdida de pequeños cationes, como K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , lo que origina la muerte del parásito (Kinsky, 1970; Gray *et al.*, 2012). Su toxicidad se atribuye a la similitud entre el ergosterol y el colesterol de las membranas celulares de los mamíferos (Palacios *et al.*, 2011).

La AmB es actualmente el fármaco más eficaz en el tratamiento de la LV humana, siendo su forma liposomal la primera línea de tratamiento en Europa, Estados Unidos y Asia (Chappuis *et al.*, 2007; Sundar *et al.*, 2010; 2011), a pesar de su nefrotoxicidad. Esto se debe en parte a la aparición de resistencia a los antimoniales (Baneth y Shaw, 2002; Croft *et al.*, 2006). Sin embargo, la necesidad de administrarlo por vía i.v., así como su elevado coste, hacen que esté fuera de alcance en muchos países en desarrollo (Singh *et al.*, 2006). El consenso en medicina veterinaria es limitar su uso excepto en casos excepcionales dado que se trata del principio activo de

elección en el tratamiento de la leishmaniosis humana (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

La AmB no está disponible para los veterinarios clínicos en Europa (Bourdeau *et al.*, 2014) y su uso es limitado debido a la dificultad de su administración (i.v. en perfusión lenta), su elevado coste y los numerosos efectos adversos que conlleva. Las manifestaciones más comunes incluyen náuseas, vómitos, fiebre, temblores, flebitis localizada, anemia y especialmente nefrotoxicidad (Miró, 2013). Ya que la propia infección por *Leishmania* también produce daño a nivel renal, es imprescindible una estrecha monitorización de la función renal a lo largo de todo el tratamiento. La AmB produce vasoconstricción y una reducción en la tasa de filtración glomerular, hipokalemia y elevación de los niveles séricos de la urea y la creatinina (Berman *et al.*, 1992; Laniado-Laborín y Cabrales-Vargas, 2009).

Con el fin de aumentar la eficacia y reducir la toxicidad de la AmB convencional (Fungizona[®]), se han desarrollado nuevas formulaciones consistentes en vehiculizar la AmB, entre las que destacan las emulsiones lipídicas (Lamothe, 2001), liposomas (Oliva *et al.*, 1995), nanopartículas (Daftarian *et al.*, 2013) y microesferas (Sánchez-Brunete *et al.*, 2004). Sin embargo, el elevado coste de estas formulaciones, su complicada elaboración y su uso como primera línea de tratamiento en humanos con LV, limitan su uso en medicina veterinaria.

En perros se han llevado a cabo diferentes estudios con AmB diluida en una emulsión lipídica a base de aceite de soja (Intralipid[®]) (Nieto *et al.*, 1992; Moreno *et al.*, 1999; Lamothe, 2001; Cortadellas, 2003). Tanto Lamothe *et al.* (2001) como Cortadellas *et al.* (2003), observaron efectos adversos como anorexia, vómitos y una elevación reversible en los niveles

séricos de creatinina. No obstante, se observó una elevada eficacia clínica inicial en todos los animales.

La AmB encapsulada en liposomas (Ambisome[®]) es mucho menos tóxica que la AmB convencional, y ha demostrado ser más eficaz en humanos, poseer menos efectos adversos y una menor tasa de recidivas (Gradoni *et al.*, 2003). En un estudio llevado a cabo por Oliva *et al.* (1995) se administró dicha formulación liposomal a 13 perros con infección natural por *L. infantum*, observando una rápida curación clínica, aunque se produjeron recidivas en 12 animales al cabo de 4-6 meses y todos los perros continuaron albergando parásitos tras el tratamiento. Debido a que Ambisome[®] es el tratamiento de elección en humanos, su uso en medicina veterinaria no está recomendado (Ciaramella y Corona, 2003).

El estado de agregación y el tamaño de partícula juegan un papel en la toxicidad, distribución y eficacia de un fármaco (Espada *et al.*, 2008c). Ambos parámetros están íntimamente ligados, de manera que durante el proceso de agregación de la AmB en medio acuoso se forman agregados de mayor tamaño, dando lugar a un tamaño medio de partícula muy superior al de la AmB en estado dimérico (AmB convencional). La AmB poliagregada posee una menor toxicidad sobre las células de los mamíferos (van Etten *et al.*, 2000; Bartlett *et al.*, 2004), como se ha demostrado previamente *in vitro* e *in vivo* en ratones (Gaboriau *et al.*, 1997; van Etten *et al.*, 2000; Espada *et al.*, 2008a; Espada *et al.*, 2008b; Mohamed-Ahmed *et al.*, 2013).

Ambisome[®] se acumula en los tejidos y, debido a su formulación en liposomas, se libera y excreta lentamente (Bekersky *et al.*, 2002), hecho que, en teoría, podría incrementar el riesgo de aislados resistentes, sin embargo, a pesar de haberse utilizado globalmente durante más de medio siglo en humanos, no se han descrito resistencias (Shakya *et al.*, 2011).

- Alopurinol

El alopurinol es un análogo estructural de la hipoxantina, que es metabolizado por los parásitos de *Leishmania* para producir un análogo inactivado de inosina. Éste es incorporado en el ARN de *Leishmania* causando la formación de sustancias tóxicas que conllevan un error en la síntesis proteica, actuando como parasitostático (Baneth y Shaw, 2002).

La dosis habitual empleada es de 10-20 mg/kg/día (v.o.), repartida en 2 tomas como terapia de mantenimiento a largo plazo, entre 6 y 18 meses. La duración del tratamiento con alopurinol no está bien definida. Solano-Gallego *et al.* (2011) recomiendan interrumpir la dosis de alopurinol cuando se consiguen las condiciones siguientes: 1) Una recuperación física y clínicopatológica completa al menos durante un año desde el inicio del tratamiento, y 2) una reducción marcada del título de anticuerpos.

Este compuesto se utiliza ampliamente en Europa, ya que es seguro, económico, se administra por vía oral y no se emplea para tratar la leishmaniosis humana (Torres *et al.*, 2011). El interés en el uso del alopurinol reside sobre todo en la prevención de las recidivas, ya que cuando se administra por periodos superiores a 5 meses, la probabilidad de recidivas es mucho menor que cuando se administra únicamente antimonio de n-metilglucamina (4-11% frente a 32-100%) (Noli y Auxilia, 2005).

A pesar de que la eficacia del alopurinol como monoterapia es pobre (Koutinas *et al.*, 2001), se emplea en países donde los antimoniales pentavalentes y la miltefosina no están disponibles, como ocurre en Brasil (Helm *et al.*, 2013) y en animales en estadio III-IV de LeishVet (Solano-Gallego *et al.*, 2011) por no ser nefrotóxico y tener el potencial de reducir la gravedad del daño glomerular y la proteinuria (Plevraki *et al.*, 2006). El

alopurinol no es capaz de eliminar amastigotes de la MO de perros infectados (Papadogiannakis *et al.*, 2010a) ni en LN (Paradies *et al.*, 2012).

Los perros tratados únicamente con alopurinol, a pesar de poder mostrar una mejoría clínica (Koutinas *et al.*, 2001), permanecen infectados y las recidivas son frecuentes. Sin embargo, mediante xenodiagnóstico se ha demostrado la ausencia de transmisión del parásito a los flebotomos. Este hecho es importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que a pesar de que el alopurinol no sea eficaz como terapia de choque, puede aplicarse en tratamientos de mantenimiento a largo plazo (6-12 meses) (Miró *et al.*, 2011a).

A pesar de que los efectos adversos causados por el uso de alopurinol son poco frecuentes, la función hepática y renal deben monitorizarse durante su uso prolongado, ya que puede producirse xantínuria y la formación de urolitos de xantina en aproximadamente el 12% de los perros tratados (Torres *et al.*, 2011). No obstante, haciendo urianálisis periódicos, llevando una alimentación equilibrada y asegurando una correcta hidratación se previenen episodios de urolitiasis (Torres *et al.*, 2011), y en perros con tratamientos prolongados se pueden monitorizar las posibles nefrolitiasis con ecografía abdominal (Miró, 2013).

En el estudio de Manna *et al.* (2015), de los 19 perros tratados diariamente con alopurinol durante 6 años, ninguno desarrolló urolitiasis, y tan sólo dos perros tuvieron prurito como consecuencia de una posible hipersensibilidad al tratamiento prolongado con alopurinol, como se ha observado en humanos (Jung *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015).

- Aminosidina

La aminosidina, también denominada paramomicina, es un aminoglucósido con actividad antimicrobiana y antiprotozoaria. Posee buena eficacia clínica, pero se asocia a efectos adversos graves cuando se administra a dosis superiores a 20 mg/kg (Vexenat *et al.*, 1998; Noli y Auxilia, 2005). Su mecanismo de acción frente a *Leishmania* consiste en alterar la asociación de la subunidad ribosomal mediante el bloqueo de la síntesis proteica (Sundar y Rai, 2002; Davidson *et al.*, 2009).

Se han estudiado diversos protocolos de tratamiento con aminosidina en perros (Poli *et al.*, 1997; Athanasiou *et al.*, 2014). En un estudio piloto reciente en que se administró por vía s.c. una dosis única diaria de 15 mg/kg durante 21 días en perros sin azotemia ni proteinuria (estadio I y IIa de LeishVet) los parámetros clínicos, serológicos y parasitológicos mejoraron durante los tres meses post-tratamiento (Athanasiou *et al.*, 2013). Además, con dicho protocolo, no se ha observado nefrotoxicidad en perros sanos ni en perros con Lcan (Athanasiou *et al.*, 2014). Sin embargo, al igual que pasa con el resto de fármacos, no consiguió eliminar el parásito de LN ni MO.

En perros, la aminosidina también se ha combinado con antimoniales pentavalentes, con el fin de mejorar su eficacia clínica y parasitológica (Belloli *et al.*, 1995; Oliva *et al.*, 1998), con una dosis de aminosidina de 5 mg/kg/24 horas, vía s.c., durante 3 semanas, junto con 60 mg/kg/12 horas de antimonio de n-metilglucamina, vía i.m., durante 4 semanas (Oliva *et al.*, 2010).

La gran limitación de este fármaco es su toxicidad renal y vestibular, estando contraindicado su uso en perros con leishmaniosis y enfermedad renal (Oliva *et al.*, 1998; Ciaramella y Corona, 2003). Las ventajas que ofrece

son su bajo coste, disponibilidad comercial, una sola administración diaria, eficacia y seguridad cuando se emplean a la dosis adecuada, y que no se emplea para tratar la LV humana en los países de la cuenca mediterránea (Athanasίου *et al.*, 2013). No obstante, son necesarios muchos más estudios, con mayor número de animales, de mayor duración, así como valorar su posible combinación con alopurinol. Actualmente está en desuso (Miró, 2013).

- **Pentamidina**

Es una diamidina aromática utilizada en el tratamiento de la tripanosomosis y durante años se consideró como el tratamiento de segunda elección en la leishmaniosis humana (Oliva *et al.*, 2010), especialmente en casos de resistencia a los antimoniales (Jha *et al.*, 1991). Su mecanismo de acción no está claro, pero parece alterar el metabolismo de las proteínas y ácidos nucleicos, desorganizando el ADN, con el que las diamidinas forman complejos.

Su uso está muy limitado debido a su elevado coste y, principalmente, a una serie de efectos adversos graves tanto agudos (irritabilidad muscular en el punto de inoculación, hipotensión, náuseas, vómitos, salivación, diarrea, shock anafiláctico), como crónicos (hipoglucemia, diabetes mellitus, daño hepato-renal, trombocitopenia) (Ciaramella y Corona, 2003). Además, en medicina humana, debido a su baja tasa de curación (70%) su uso se ha reducido (Jha *et al.*, 1991).

La dosis de pentamidina más empleada es de 4 mg/kg, por vía i.m. profunda, en 3 dosis semanales durante 5-7 semanas, o 20 inyecciones en días alternos (Rhalem *et al.*, 1999). La mayoría de los perros tratados mejoran clínicamente, pero las recidivas son frecuentes (Baneth y Shaw, 2002).

- **Quinolonas**

- **Marbofloxacin**

Es una fluoroquinolona de tercera generación disponible en medicina veterinaria. Posee una actividad potente frente a numerosas bacterias gram-negativas y gram-positivas. Posee actividad leishmanicida *in vitro* a través del FNT- α y la vía iNOS resultado en la producción de dióxido de nitrógeno (NO₂) por los macrófagos y pudiendo eliminar eficazmente de esta manera los amastigotes (Vouldoukis *et al.*, 2006), aunque su eficacia en comparación con la miltefosina es menor (Farca *et al.*, 2012).

La biodisponibilidad del marbofloxacin es próxima al 100% y su unión a proteínas plasmáticas es baja. Además, presenta un gran volumen de distribución y posee una vida media de eliminación de 14 horas, que facilita su administración única diaria (Schneider *et al.*, 1996).

El protocolo de administración que proporciona mejores resultados en el tratamiento de la Lcan consiste en 2 mg/kg/24 horas, v.o., durante 28 días (Rougier *et al.*, 2008). Con dicho tratamiento se ha observado una mejoría clínica y una reducción en el número de amastigotes observados en citología de aspirados de LN poplíteo. En dicho estudio se observaron recidivas en tres perros (n=24) durante los 9 meses de seguimiento, dos de los cuales fueron tratados durante 40 días, y uno durante 28 días (Rougier *et al.*, 2008). Más recientemente Rougier *et al.* (2012) con el mismo protocolo trataron 74 perros, observando resultados similares, con una eficacia clínica aproximada del 70%, aunque el 52,6% de los perros recidivaron al cabo de los 5,5 meses y los LN seguían albergando parásitos durante los 12 meses de seguimiento. No se han descrito efectos adversos con este tratamiento (Rougier *et al.*, 2008; 2012).

- **Enrofloxacin**

Es una fluoroquinolona capaz de estimular la actividad leishmanicida de los macrófagos *in vitro* mediante la generación de NO, a pesar de no ejercer una actividad directa sobre el parásito. Dicha eficacia se ha evaluado *in vivo*, por sí sola o en combinación con metronidazol en perros con leishmaniosis (Bianciardi *et al.*, 2004). A pesar de hallar una mejoría clínica parcial y de corta duración, los autores no recomiendan su empleo en monoterapia ni en combinación con metronidazol, y sólo proponen su uso para tratar infecciones bacterianas secundarias cutáneas.

- Derivados del imidazol

Los imidazoles son compuestos antifúngicos, algunos con actividad frente a bacterias y protozoos, incluida *Leishmania*. Los efectos adversos que producen son frecuentes, como anorexia, vómitos y hepatotoxicidad (Ciaramella y Corona, 2003).

Los principios activos empleados en Lcan son el metronidazol y el ketoconazol.

• Metronidazol

Es un derivado del grupo de los nitroimidazoles con propiedades antibacterianas, antiprotozoarias y antiinflamatorias y posee actividad leishmanicida *in vitro*. Algunos estudios han utilizado el metronidazol asociado a otros principios activos, como espiramicina (Pennisi *et al.*, 2005a), enrofloxacin (Bianciardi *et al.*, 2004) frente a la Lcan, observándose una mejoría clínica en los perros tratados, pero los resultados son siempre menos favorables que con las combinaciones con alopurinol, y no existe una curación parasitológica.

- **Ketoconazol**

Existen muy pocos estudios en la bibliografía sobre este principio activo en el tratamiento de la Lcan, probablemente debido a su alta nefrotoxicidad, por lo que su uso está contraindicado en perros con azotemia (Bianciardi *et al.*, 2004; Miró *et al.*, 2008). Se ha empleado a dosis de 25 mg/kg/día v.o. durante tres meses (Bianciardi *et al.*, 2004).

2.5.1.2. Capacidad infectante de los perros tratados

La valoración de la capacidad infectante de un hospedador ha de llevarse a cabo mediante xenodiagnóstico, con colonias de flebotomos no infectadas mantenidas en laboratorio (Molina *et al.*, 1994). Quinzel y Courtenay (2009) llevaron a cabo un estudio para evaluar la relación entre la capacidad infectante y la condición clínica, basándose en siete estudios publicados (Molina *et al.*, 1994; Guarga *et al.*, 2000a; Travi *et al.*, 2001; Courtenay *et al.*, 2002; da Costa-Val *et al.*, 2007; Michalsky *et al.*, 2007; Verçosa *et al.*, 2008), observando que tanto los perros enfermos como los infectados clínicamente sanos, eran infectantes para el vector. Existe una correlación positiva entre la tasa infectante, la gravedad del cuadro clínico, el título de anticuerpos y niveles bajos de LTh CD4+ (Courtenay *et al.*, 2002; Guarga *et al.*, 2000b; da Costa-Val *et al.*, 2007). En cambio, la capacidad infectante disminuye después del tratamiento (Guarga *et al.*, 2002; Vergel *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2011a).

Guarga *et al.* (2000a) detectaron una correlación inversa entre el número de signos clínicos de los perros enfermos y el porcentaje de flebotomos alimentados, lo cual podría indicar la preferencia de las hembras de flebotomos por alimentarse sobre tejido tegumentario sin lesiones, hecho que podría favorecer la transmisión de la enfermedad, al preferir un vector infectado alimentarse sobre una epidermis aparentemente sana de animales

no infectados. Laurenti *et al.* (2013) observaron también una correlación inversa entre la tasa de flebotomos infectados y la gravedad del cuadro clínico, presentando los perros con lesiones cutáneas menor capacidad infectante que los perros sin signos clínicos. Los autores atribuyeron esto a que la presencia de lesiones cutáneas con patógenos secundarios podría interferir negativamente en la alimentación del vector (Adler y Theodor, 1931). Por el contrario, Vexenat *et al.* (1994) observaron que la piel con lesiones en pabellones auditivos en perros con Lcan era más atractiva para los flebotomos.

Algunos autores han observado que no existe correlación entre la carga parasitaria presente en la piel de los animales infectados y la capacidad de transmisión del parásito a los flebotomos (Travi *et al.*, 2001; Laurenti *et al.*, 2013). Sin embargo, Laurenti *et al.* (2013) encontraron una asociación positiva entre la presencia de parásitos en LN y resultados positivos en el xenodiagnóstico.

Aunque la relación entre la tasa infectante y la gravedad del cuadro clínica hallada en Europa y en Sudamérica es similar, la proporción de perros infectantes es mayor en Europa que en Sudamérica, reflejada además en un mayor número de flebotomos infectados en Europa. Esto puede indicar una mayor susceptibilidad de *P. perniciosus* a la infección que *L. longipalpis*, o posibles diferencias entre las poblaciones caninas de ambos continentes (p.e. la raza) (Quinnell y Courtenay, 2009).

En España, las tasas de infección de los flebotomos obtenidas mediante disección y aislamiento del parásito oscilan entre 0,4 y 4,6% (Suárez *et al.*, 2012), mientras que mediante técnicas moleculares las tasas medias de infección alcanzaron el 39% en áreas con elevada prevalencia de Lcan (Martín-Sánchez *et al.*, 2009).

2.5.1.3. Seguimiento post-tratamiento y pronóstico

Se han publicado distintas guías o directrices que proponen estrategias de tratamiento y seguimiento de los perros con Lcan (Oliva *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Roura *et al.*, 2013).

Los parámetros clínicos y clinicopatológicos (hematología, bioquímica hepato-renal, electroforesis de proteínas séricas, así como el urianálisis completo, incluyendo UPC) deberían realizarse al finalizar el primer mes de tratamiento, después cada 3-4 meses hasta una recuperación completa, y posteriormente cada 6-12 meses (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2011; Roura *et al.*, 2013).

La mayoría de los perros tratados experimentan una mejoría clínica durante el primer mes de tratamiento, aunque algunos requieren un periodo de tiempo mayor (Miró, 2013).

Se recomienda realizar un serología cuantitativa a los 6 meses post-tratamiento, en el mismo laboratorio, debido a la vida media elevada de IgG y a la presencia inicial de niveles elevados de anticuerpos en perros enfermos y después deberían cuantificarse cada 6-12 meses, de manera que un incremento de dos títulos puede considerarse indicativo de recidivas (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Además, puede medirse la carga parasitaria a través de qPCR, de forma que un descenso significaría una buena respuesta al tratamiento, mientras que un incremento puede sugerir una recidiva (Manna *et al.*, 2008a; 2008b).

El pronóstico de la leishmaniosis depende de la clasificación clínica, de la patología y, en perros enfermos, de la gravedad de las alteraciones clinicopatológicas, especialmente de si hay o no enfermedad renal, así como de la respuesta al tratamiento. Desafortunadamente, no resulta fácil

predecir el pronóstico de los perros con Lcan y recientemente el enfoque se ha centrado en la clasificación clínica de Lcan con el fin de identificar el tratamiento más eficaz y predecir el resultado (**Tabla VIII**).

Tabla VIII. Estadios clínicos de leishmaniosis canina y tipos de tratamiento y pronóstico para cada estadio (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Estadio clínico	Tratamiento	Pronóstico
I (Enfermedad leve)	Seguimiento sin tratamiento / alopurinol o antimonio de n-metilglucamina o miltefosina / alopurinol + antimonio de n-metilglucamina o alopurinol + miltefosina*	Favorable
II (Enfermedad moderada)	Alopurinol + antimonio de n-metilglucamina o alopurinol + miltefosina	Favorable -reservado
III (Enfermedad grave)	Alopurinol + antimonio de n-metilglucamina o alopurinol + miltefosina Seguir recomendaciones IRIS ¹ para IRC	Reservado-grave
IV (Enfermedad muy grave)	Alopurinol (solo) Seguir recomendaciones IRIS para IRC	Grave

*El comienzo del tratamiento depende de cada caso y debe siempre individualizarse. Los perros en *estadio* I normalmente requieren tratamientos menos prolongados, o bien la combinación de dos fármacos, o de manera alternativa el seguimiento sin tratamiento. ¹IRIS: International Renal Interest Society (www.iris-kidney.com)

La IRC es el principal factor pronóstico en Lcan, ya que es la principal causa de mortalidad o de recomendar la eutanasia (estadios IRIS III y IV). Un tratamiento adecuado permite reducir la enfermedad renal e incrementar el tiempo de supervivencia (Goldstein *et al.*, 2013). La valoración de la función

renal debe incluir hematología, bioquímica, urianálisis completo y valoración de la presión arterial una vez confirmada la enfermedad renal.

Las tasas de supervivencia están aumentando debido a un manejo clínico mejorado y a la aparición de herramientas preventivas nuevas, como repelentes tópicos, vacunas e inmunomoduladores (Bourdeau *et al.*, 2014). El tiempo medio de supervivencia de los animales tratados se ha estimado en 4,7 años, siendo mayor en perros sin hipoalbuminemia, proteinuria y azotemia renal (Geisweid *et al.*, 2012). Otros autores pronostican tiempos de supervivencia mayores tras un tratamiento adecuado, de hasta 9 años, y con una buena calidad de vida, en perros en estadio II de Lcan (Torres *et al.*, 2011).

2.5.1.4. Inmunoterapia

Los fármacos inmunomoduladores pueden dividirse en dos grupos, inmunosupresores o inmunoestimulantes, según su actividad sobre el sistema inmunitario. Normalmente se asocian a tratamientos específicos.

2.5.1.4.1. Fármacos inmunosupresores

Los más empleados son los glucocorticoides, principalmente la prednisona y la prednisolona (1-2 mg/kg, v.o.).

Estos fármacos actúan deprimiendo la inmunidad humoral, y por tanto, disminuyen la producción de anticuerpos y la formación de IC. Pero también deprimen la inmunidad celular al reducir la capacidad de los LT para producir IL-2, interfiriendo en el reconocimiento de los antígenos por parte del CMH II. Además, se necesitan dosis altas para deprimir la inmunidad humoral, aumentando el riesgo de efectos adversos. Por tanto, deben evitarse ya que pueden incrementar la replicación del parásito, y sólo se

recomienda cuando aparecen lesiones concomitantes por IC (p.e. uveítis, poliartritis, glomerulonefritis) (Ciaramella y Corona, 2003).

2.5.1.4.2. Fármacos inmunoestimulantes

El objetivo fundamental es estimular la respuesta inmune celular y la activación de los macrófagos. Los inmunoestimulantes utilizados en perros con Lcan incluyen el levamisol, las citoquinas, el agregado proteico de magnesio-amoniofosfolinoleato-palmitoleato anhídrido (P-MAPA) y la domperidona.

- Domperidona

Es un fármaco procinético gástrico y antiemético con actividad anti-D2 (antagonista de la dopamina). Estimula la producción de serotonina, la cual incrementa la secreción de prolactina (Berczi *et al.*, 2000). La prolactina es una hormona neuroendocrina, producida principalmente en la hipófisis y que, además de participar en la producción de leche, tiene la capacidad de estimular la respuesta inmune celular mediada por linfocitos Th1 CD4+, con la liberación de IL-2, IL-12, IFN- γ y FNT- α . Esto induce una activación de macrófagos y células NK, seguida de una reducción de LTh2 CD4+ y FNT- β (Hinterberger-Fischer, 2000; Matera y Mori, 2000). En perros clínicamente sanos y seronegativos, la administración repetida de domperidona ha demostrado inducir un incremento significativo, aunque temporal, del porcentaje de células fagocíticas, como neutrófilos y macrófagos, implicadas en la respuesta inmune innata (Gómez-Ochoa *et al.*, 2012).

Recientemente, la domperidona se ha comercializado en el mercado veterinario en forma de suspensión oral (Leisguard®, Lab. Dr. ESTEVE, S.A.) indicada para la prevención y tratamiento de la Lcan en perros en estadios iniciales de la enfermedad.

En un estudio en el que se administró domperidona a la dosis de 1 mg/kg/12 horas v.o. durante un mes a perros con infección natural por *L. infantum* se observó una remisión clínica en 94/98 perros en el día 90 p.t., una reducción en el título de anticuerpos y la activación de la inmunidad celular, confirmada mediante DTH y LPA (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009).

Sabaté *et al.* (2014) investigaron la eficacia de la domperidona en la prevención y el tratamiento de la Lcan a la dosis recomendada (0,5 mg/kg/12 horas durante 30 días, v.o., cada 4 meses). Para ello compararon dos grupos de perros seronegativos, uno tratado con domperidona y otro sin tratar, residentes en una zona altamente endémica de *L. infantum*. Durante 21 meses de seguimiento observaron una tasa de prevención del 77% en los animales tratados, y una reducción del riesgo de presentar signos clínicos de leishmaniosis 7 veces inferior al de los no tratados. En comparación, la vacuna actualmente comercializada en España (Canileish®, Virbac), bajo condiciones similares presenta una reducción de riesgo de padecer Lcan de 4 veces en animales vacunados (Bongiorno *et al.*, 2013).

En cuanto a los efectos adversos que se han descrito para la domperidona son poco frecuentes, leves y autolimitantes, como galactorrea a los 7-9 días del inicio del tratamiento y diarrea leve (Sabaté *et al.*, 2014). No se han descrito alteraciones neurológicas asociadas a la domperidona puesto que no atraviesa la barrera hematoencefálica (Matera y Mori, 2000).

- **Autovacuna**

En 2012 se comercializó en España una autovacuna (Leishtop®, Diomune SL.) para el tratamiento de la Lcan.

Se trata de una inmunoterapia individual y exclusiva para cada animal tratado. Esta autovacuna se elabora a partir de un aspirado de LN o MO del animal enfermo, del que se obtienen amastigotes de *Leishmania* y se

conservan en un medio específico para su posterior cultivo. Los promastigotes obtenidos son neutralizados y procesados mediante la técnica de inmunofluorescencia *in vivo* (Calvo-Álvarez *et al.*, 2012), por la cual se somete al antígeno aislado a un proceso de estabilización específico que determinará la optimización de la respuesta inmunitaria en el animal tratado. Tras su administración, se produce activación de la respuesta inmune celular, mediante una potente respuesta Th1, con aumento de ciertas citoquinas (IL-12, FNT- α), sin modificar los niveles de otras citoquinas necesarias para el correcto funcionamiento de la respuesta Th2 (p.e. IL-4) (Hernández *et al.*, 2013).

El protocolo de administración consiste en una primera inmunización (1 ml, s.c.) seguida de una segunda a los 15 días (1 ml, s.c.). Hasta la fecha solo existe un estudio presentado sobre la eficacia de la autovacuna (Hernández *et al.*, 2013), en el cual 44 perros con infección natural por *L. infantum*, seropositivos, con signos clínicos y/o alteraciones clinicopatológicas, fueron tratados con dos dosis de autovacuna y monitorizados durante dos meses. El 85% de los animales mejoraron clínicamente a los dos meses post-tratamiento, mientras que el 15% restante no tuvieron una evolución favorable y requirieron un tratamiento leishmanicida. Los títulos de anticuerpos se mantuvieron estables, pero se observó un aumento de un 52,5% en la ratio IgG2/IgG1 y una reducción en la carga parasitaria en MO/LN del 42 y 70% mediante citología y qPCR, respectivamente. Además, no se observaron reacciones adversas.

Las ventajas de este tratamiento son su eficacia clínica y parasitológica, compatibilidad con otros tratamientos leishmanicidas o leishmanioestáticos, así como la seguridad a nivel renal y hepático. Las desventajas, por ahora son los costes, la dificultad de hacer un seguimiento de los perros tratados por la elevada producción de anticuerpos que no son

discriminados por las técnicas serológicas convencionales, además de la necesidad de realizar una toma de muestras invasiva (LN o MO) antes de iniciar el tratamiento.

- **Levamisol**

Aunque se puede considerar que el levamisol es un inmunoestimulante en el tratamiento de algunas helmintosis animales, no se utiliza de forma habitual en el tratamiento de la Lcan y cuando se emplea va siempre asociado a un tratamiento específico convencional, ya que no existen suficientes evidencias científicas que demuestren su eficacia frente a esta enfermedad. Mientras que unos autores obtienen resultados pobres o inexistentes (Barta *et al.*, 1992), otros aseguran su eficacia en combinación con alopurinol (Lorente *et al.*, 2006), pero sin descartar que estos resultados positivos se deban al alopurinol.

- **Citoquinas**

La producción de IL-2 e IFN- γ por parte de las células T está disminuida durante la infección por *Leishmania*. La incorporación al mercado de citoquinas recombinantes, ha abierto nuevas posibilidades terapéuticas.

El IFN- γ produce la activación de los macrófagos con inducción en la síntesis de IL-1 y FNT- α , aumenta la expresión de los genes que regulan el CMH II, induce la respuesta inmunitaria protectora mediada por linfocitos Th1 CD4+ y, en el caso de la leishmaniosis, potencia el depósito de los antimoniales en el interior de los macrófagos (de Lima *et al.*, 2007).

Aunque la información existente acerca del tratamiento con citoquinas en perros es escasa, se ha observado que los perros que desarrollan una respuesta celular de tipo Th1 permanecen clínicamente sanos, por lo que algunos autores consideran que la inducción de IFN- γ ,

mediante el tratamiento con citoquinas, constituye una alternativa terapéutica con bastantes posibilidades de éxito (Miró, 2013).

También se ha estudiado la eficacia del interferón- ω felino a una dosis de 0,1 ml/kg/cada 48 horas vía s.c. durante cinco días consecutivos asociado al Glucantime® en perros con infección natural por *L. infantum* (Proverbio *et al.*, 2005). Dichos autores obtuvieron buenos resultados tanto clínicos como laboratoriales con dicha combinación.

- **Agregado protéico de anhídrido de magnesio-amónico fosfolinoleato-palmitoleato (P-MAPA)**

Es un compuesto obtenido de la fermentación del hongo *Aspergillus oryzae*, estimulante de la respuesta inmune celular, mediante el aumento de proliferación de células esplénicas y la producción de citoquinas IL-2, IFN- γ y células NK. Además, estimula la mielopoyesis y posee actividad antitumoral y antimicrobiana (Santiago *et al.*, 2013).

Estos autores proponen su uso como coadyuvante en el tratamiento de la Lcan, tras realizar un estudio en perros con leishmaniosis, a los que se administró 2 mg/kg cada 3 días durante un total de 45 días, vía i.m. Posteriormente, observaron una reducción de los signos clínicos y de la carga parasitaria en piel, así como de los niveles séricos de IL-10, mientras que los niveles de IL-2, IFN- γ y LT CD8+ incrementaron sin producir reacciones adversas.

Son necesarios más estudios con un mayor número de perros y periodos de seguimiento más largos para valorar la eficacia de los inmunomoduladores.

2.5.1.5. Resistencias

Aunque en medicina humana se ha descrito la resistencia de *Leishmania* a los antimoniales pentavalentes, AmB, miltefosina y aminosidina

(Croft *et al.*, 2006), existe muy poca información al respecto en medicina veterinaria. Actualmente no hay marcadores moleculares de resistencia disponibles para los fármacos anti-*Leishmania*. Por ello, el único método seguro para el seguimiento de aislados resistentes consiste en utilizar modelos amastigote-macrófago *in vitro* (Croft *et al.*, 2006).

Además de los factores farmacológicos, existen una serie de factores del hospedador que son responsables de la propagación de la resistencia a fármacos en la leishmaniosis humana. Entre ellos están el seguimiento inadecuado de los casos de resistencia, los métodos diagnósticos, la falta de consenso, la disponibilidad de los fármacos, la calidad de los mismos y su limitada distribución así como el acceso limitado a los centros de atención sanitaria para el tratamiento precoz en países en desarrollo (Mohapatra, 2014). En áreas endémicas de LV antroponótica, especialmente en la región de Bihar, India, se han ido seleccionando las cepas más resistentes a antimoniales pentavalentes, de manera que se han extendido rápidamente por todo el país (Berman, 2006). Solo el 64% de los casos nuevos de LV humana en Bihar eran sensibles a los antimoniales y el 100% de los casos en los distritos de Sitamari y Darbhanga eran resistentes (Mishra *et al.*, 1992).

En perros se ha documentado una reducción en la sensibilidad frente a los antimoniales de aislados de *L. infantum* tras varios ciclos de tratamiento (Gramiccia *et al.*, 1992; Carrió y Portús, 2002). Maia *et al.* (2013) describieron una eficacia baja de los leishmanicidas disponibles sobre los aislados de *Leishmania* de perros. Este hecho debería tenerse en cuenta, ya que los perros al no curarse parasitológicamente son tratados frecuentemente varias veces con el mismo compuesto, permitiendo, por tanto, la selección y transmisión de parásitos resistentes a los antimoniales pentavalentes (Serenio *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado la capacidad que poseen los aislados de *L. infantum* resistentes a los antimoniales pentavalentes de

desarrollarse en los flebotomos (*P. perniciosus* y *L. longipalpis*), manteniendo sus características de resistencia, sin alterar el ciclo en su vector natural (Gradoni *et al.*, 1987; Seblova *et al.*, 2014).

En cuanto al alopurinol, no existen, hasta la fecha, estudios publicados en los que se haya analizado *in vitro* el efecto sobre aislados de *L. infantum*, ni se han descrito resistencias al mismo. Sin embargo, algunos autores no recomiendan su uso en monoterapia en el tratamiento de la Lcan, ya que los parásitos parecen adaptarse fácilmente a este compuesto (Maia *et al.*, 2013) y son frecuentes las recidivas (Miró, 2013).

A pesar de haberse documentado pocos casos de resistencia a la miltefosina, recientemente, se han descrito casos en humanos en Nepal (Pandey *et al.*, 2012). Debido a la transmisión antroponótica en el subcontinente indio, un mal uso de este fármaco junto con su elevada vida media, suponen un riesgo para la aparición rápida de resistencias en el futuro (Zerpa *et al.*, 2007; Bhandari *et al.*, 2012).

Una explicación de la falta de resistencias de la AmB podría ser precisamente su doble mecanismo de acción, por un lado su unión al ergosterol de la membrana, un lípido vital funcionalmente, que constituye su principal mecanismo antimicrobiano y, por otro lado, la permeabilización de dicha membrana a través de los canales iónicos (Gray *et al.*, 2012). Otra posible explicación sería que los parásitos mueren rápidamente tras la administración de AmB, por lo que apenas tendrían oportunidad de desarrollarse aislados resistentes (Shakya *et al.*, 2011).

2.5.2. Prevención

Aunque actualmente no hay ninguna medida preventiva que ofrezca una garantía del 100%, el uso tópico de insecticidas/repelentes (piretroides)

de forma regular en el perro ha demostrado una eficacia elevada en la reducción de la infección por *Leishmania*.

2.5.2.1. Lucha antivectorial

Evitar la picadura de los flebotomos es fundamental en la prevención de la infección por *L. infantum* en perros y ha demostrado una clara reducción de la incidencia de la enfermedad (Otranto *et al.*, 2013).

Existen una serie de acciones destinadas a evitar la transmisión de *Leishmania* a los flebotomos, cuyo objetivo es impedir la picadura del vector e incluso reducir sus poblaciones:

1) mantener a los perros en el interior de la vivienda, fundamentalmente desde el atardecer hasta el amanecer durante la época de actividad del vector, ya que es cuando los flebotomos se alimentan (Martín-Sánchez *et al.*, 2009; Gálvez *et al.*, 2010b).

2) reducir los microhabitat favorables para los flebotomos, como los escombros y la acumulación de maderas y piedras, grietas y fisuras en las paredes, en las proximidades de las viviendas y otros lugares frecuentados por perros (Sharma y Singh, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011). Esta medida es uno de los pocos ejemplos de control eficaz frente a los flebotomos (Alexander y Maroli, 2003).

3) el rociamiento del interior de las viviendas con insecticidas residuales, incluyendo paredes interiores, ventanas, grietas, establos, gallineros, etc. (Alexander y Maroli, 2003; Sharma y Singh, 2008; Quinnell y Courtenay, 2009). Para completar el control intradomiciliario deben colocarse mallas protectoras. Algunos autores, sin embargo, consideran que la nebulización espacial para el control de los flebotomos adultos no es útil y

el efecto residual de la pulverización de paredes en las viviendas es muy corto (Romero y Boelaert, 2010).

4) el uso de cortinas y mosquiteras finas apropiadas (con una luz no superior a 0,3-0,4 mm²), pudiendo tratarse con piretroides (Alexander y Maroli, 2003; Miró y Molina, 2006; Quinnell y Courtenay, 2009; Bray y Hamilton, 2013).

5) aplicación de insecticidas/repelentes tópicos de probada eficacia sobre los perros (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

La eliminación masiva del vector, llevada a cabo en algunas enfermedades transmitidas por vectores, no se considera una medida apropiada para el control de los flebotomos por razones biológicas, técnicas y económicas (Otranto y Dantas-Torres, 2013) ya que tienden a habitar zonas focales en lugar de tener una amplia distribución (Gálvez *et al.*, 2010b). El control ambiental de las fases inmaduras es inviable ya que los microhabitat de las larvas y pupas son extremadamente variables, incluyendo raíces y agujeros de árboles, madrigueras de animales y follaje en descomposición (Maroli *et al.*, 2013). El peligro para el medio ambiente y la salud que conlleva el uso de organoclorados y otros productos químicos (p.e., organofosfatos y carbamatos) ha hecho que se sustituyan progresivamente por piretroides sintéticos, los cuales son los empleados actualmente por las autoridades sanitarias en varios países (Otranto y Dantas-Torres, 2013).

Existen una gran variedad de productos tópicos, siendo los piretroides sintéticos los más ampliamente comercializados, debido a que combinan una buena eficacia frente a los flebotomos y pocos efectos tóxicos en los perros (Gramiccia, 2011). Constituyen la herramienta más eficaz en la prevención de la infección por *L. infantum* en perros (Otranto y Dantas-Torres, 2013). Están disponibles en forma de pulverizaciones, pipetas y

collares con diferentes tiempos de liberación del producto y por lo tanto con diferentes tiempos de aplicación (Gramiccia, 2011). Estos productos poseen un doble efecto, 1) repelente (protección individual) mediante el cual se interrumpe la transmisión al tener una acción irritante y producir la desorientación del flebotomo, que no llega a ingerir sangre del hospedador, e 2) insecticida (protección en masa) matando al vector que se haya alimentado del perro tratado o simplemente se haya posado sobre él (Otranto y Dantas-Torres, 2013; Gradoni, 2015).

Aunque algunos flebotomos pueden alimentarse sobre perros con collares repelentes/insecticidas, la mayoría mueren en unas pocas horas (Killick-Kendrick *et al.*, 1997), de forma que los posibles perros infectados apenas contribuyen a la transmisión de la infección (Brianti *et al.*, 2014). Se recomienda aplicar el primer tratamiento un mes antes de que comience la temporada de actividad de los vectores con el fin de conseguir un nivel de protección más alto (Alexander y Maroli, 2003).

Otros compuestos de nueva generación, como el imidacloprid, un insecticida nicotinoide, ejercen una intensa acción sinérgica potenciando las propiedades de los piretroides (Mencke *et al.*, 2003; Miró *et al.*, 2007a).

Los productos empleados actualmente según su formato de presentación son:

- Collares:

- a) Los collares impregnados con deltametrina (Scalibor[®], MSD) liberan lentamente el insecticida desde una banda protectora. El producto penetra en el tejido subcutáneo y se distribuye por la grasa subcutánea, alcanzando la actividad máxima en 1-2 semanas tras su aplicación. El efecto repelente es superior a 6 meses (Killick-Kendrick *et al.*, 1997;

Reithinger *et al.*, 2001). La eficacia de este collar oscila entre 50-86% (Maroli *et al.*, 2001; Ferroglia *et al.*, 2008). El uso masivo de estos collares en perros reduce significativamente la seroprevalencia de Lcan en zonas endémicas (Reithinger *et al.*, 2004; Foglia Manzillo *et al.*, 2006; Davoust *et al.*, 2013). Esto se ha observado en una zona endémica de Lcan en Irán, donde se consiguió reducir la seroconversión tanto en perros como en niños (Gavani *et al.*, 2002a), y en el sur de Francia, como demuestra un estudio de 20 años de seguimiento de 80 perros, en los que se redujo la seroprevalencia del 42,5 al 6,2% tras la aplicación del collar, observándose una reducción del riesgo de Lcan del 85,2% y una protección del 93,8% (Davoust *et al.*, 2013).

Con excepción de algunas reacciones locales descritas en perros (Aoun *et al.*, 2008) no se han documentado más efectos adversos (Maroli *et al.*, 2001).

Los collares impregnados con deltametrina han demostrado ser eficaces frente a una gran variedad de especies de flebotomos, así como en diferentes ambientes en Europa, Asia y América del Sur (Maroli *et al.*, 2001; Gavani *et al.*, 2002a; Foglia Manzillo *et al.*, 2006).

- b) El collar de matriz polimérica conteniendo una combinación al 10% de imidacloprid y 4,5% de flumetrina (Seresto[®], Bayer Animal Health) posee propiedades insecticidas y repelentes frente a pulgas y garrapatas (Stanneck *et al.*, 2012a; Brianti *et al.*, 2013). Además, posee una eficacia en prevenir la infección por *L. infantum* del 93,4 y 100%, en perros de todas las edades (Brianti *et al.*, 2014) y en perros jóvenes (Otranto *et al.*, 2013), respectivamente, en áreas hiperendémicas de Lcan durante un periodo de hasta 8 meses. En dichos estudios, la incidencia de la enfermedad fue, respectivamente, del 40,2 y 45,1% en el grupo control

de perros sin collar. Dicha eficacia se atribuye al efecto anti-alimentación de la flumetrina, que reduce el número de picaduras y por tanto, el riesgo de infección (Otranto *et al.*, 2013). La eficacia prolongada de este collar se debe a que su matriz polimérica permite la liberación controlada de los principios activos a una concentración constante (Stanneck *et al.*, 2012a; 2012b), a diferencia de los collares de deltametrina registrados (Killick-Kendrick *et al.*, 1997; Reithinger *et al.*, 2004). La tasa de protección media de esta combinación frente a Lcan es mayor que la registrada con collares de deltametrina (máximo del 86%) (Maroli *et al.*, 2001; Foglia Manzillo *et al.*, 2006). No se han descrito efectos adversos y además, posee un cierre de seguridad integral (Stanneck *et al.*, 2012a; 2012b) que hace que la tasa de pérdida de collares es menor (22,5-27%) (Otranto *et al.*, 2013; Brianti *et al.*, 2014) que la registrada con otros collares (35%) (Foglia Manzillo *et al.*, 2006).

- Formulaciones spot-on:

Se aplican mediante pipetas y también proporcionan altos niveles de repelencia, aunque su duración es mucho menor. Tan sólo requieren 24 horas para que el insecticida se distribuya uniformemente por el estrato córneo del perro (Miró *et al.*, 2008). Otra de sus ventajas es su fácil aplicación, y a diferencia de los collares, no pueden perderse ni romperse (Otranto *et al.*, 2007).

Se han empleado diferentes productos y combinaciones:

- a) Imidacloprid 10% y permetrina 50% (Advantix[®], Bayer Animal Health): Posee efecto repelente cuando se administra cada 21 días, como se ha demostrado experimentalmente frente a *P. perniciosus* (eficacia del 97,7% el día 1 y 74% el día 29 tras la aplicación) (Miró *et al.*, 2007a), y frente a *P. papatasi* (eficacia de 94,6% el día 1 y 55,9% el día 29 tras la

aplicación) (Mencke *et al.*, 2003). A su vez, en estudios de campo realizados en zonas endémicas de Lcan, con grupos control de animales sin tratar, se han observado efectos repelentes del 100% en perros jóvenes (Otranto *et al.*, 2010a) tras su aplicación cada tres semanas, de 88,9-90,36% tras su aplicación mensual, y 90,73-100% en animales tratados cada dos semanas (Otranto *et al.*, 2007). La eficacia insecticida obtenida bajo condiciones de laboratorio frente a colonias de *P. perniciosus* es moderada, probablemente debido al elevado efecto repelente: 53,2% y 2-9% los días 1 y 29 tras la aplicación, respectivamente (Miró *et al.*, 2007a). No se han observado reacciones adversas al producto (Mencke *et al.*, 2003; Miró *et al.*, 2007a; Otranto *et al.*, 2010a).

- b) Permetrina 65% (Exspot[®], MSD): un estudio preliminar, con tan sólo dos perros tratados, mostró una buena eficacia repelente (> 90%) durante las cuatro primeras semanas, e insecticida (> 61%) durante cinco semanas p.t. (Molina *et al.*, 2001). En una región endémica se observó una reducción del riesgo de infección del 84%, determinada mediante serología, en los animales tratados mensualmente con esta formulación, siendo el resultado igual al observado con collares de deltametrina (Ferroglio *et al.*, 2008).
- c) Dinotefuran 4,95%, permetrina 36,08% y piriproxifeno 0,44% (Vectra 3D[™], Ceva): esta reciente formulación *spot-on* también posee una buena eficacia repelente (96,9 y 87,0%) e insecticida (97,8 y 39,6%) los días 1 y 28 tras la primera aplicación, respectivamente, frente a *P. perniciosus* (Liénard *et al.*, 2013). Tampoco se han registrado efectos adversos tras su administración.

- d) Fipronil (67,6 mg/ml) y permetrina (504,8 mg/ml) (Frontect[®]/Frontline Tri-Act[®], Merial): En los dos estudios experimentales llevados a cabo por Dumont *et al.* (2015) la eficacia repelente tras 60 minutos de exposición a *P. perniciosus* fue 98,2 y 90,3%, en los días 1 y 29 tras la aplicación, respectivamente, y la eficacia insecticida registrada tras cuatro horas de la exposición fue 98,7 y 78,9%, respectivamente.
- e) Indoxacarb (150 mg/ml) y permetrina (480 mg/ml) (Activyl[®] Tick Plus, Merck/ MSD Animal Health): proporciona una buena eficacia repelente frente a *P. perniciosus* entre los 2 y 21 días de su aplicación (99 y 88%, respectivamente), manteniéndose hasta el día 29 (84%) sin observarse reacciones adversas. Su eficacia insecticida es bastante escasa (27% a los 2 días y 0% a los 21 días) (Frenais *et al.*, 2014). Dicho estudio es el único publicado hasta la fecha sobre el uso de esta formulación para prevenir la Lcan y se cree que su actividad insecticida se debe fundamentalmente a la permetrina, por su rápida penetración en la cutícula de los insectos y su efecto irritante o “*knock down*”, que hace que el insecto apenas entre en contacto con la piel tratada y deja de alimentarse (Beugnet y Franc, 2012), y no al indoxacarb, el cual principalmente llega al insecto por ingestión y apenas es absorbido por la cutícula (Frenais *et al.*, 2014).

- Pulverizadores

Los pulverizadores a base de permetrina y piriproxifeno poseen una actividad repelente inmediata con una eficacia del 71,4%, un efecto insecticida del 7,2% y protege durante 21 días (Molina *et al.*, 2006).

A pesar de la elevada eficacia conseguida con los piretroides tópicos, estos no pueden evitar todas las picaduras de los flebotomos potencialmente infectantes, y al contrario de lo observado en los estudios controlados, los

propietarios no los encuentran lo suficientemente eficaces (Cortes *et al.*, 2012).

2.5.2.2. Vacunas

El uso de vacunas frente a la Lcan podría suponer la herramienta más práctica y eficaz en su control, así como para reducir el riesgo de infección en humanos (Dye, 1996; Gradoni, 2001).

Una vacuna eficaz frente a *Leishmania* deberá inducir una respuesta inmune Th1 predominante, fuerte y duradera para prevenir el establecimiento de la infección inicial, lo que supone la mejor opción teórica, o bien controlar su progresión hacia la enfermedad. De esta manera, la vacuna también reduciría la transmisión de los parásitos (Gradoni, 2015). Con el fin de conseguir el máximo nivel de protección, y ya que ninguna vacuna actual proporciona una protección del 100%, la vacunación debe combinarse siempre con repelentes tópicos (Oliva *et al.*, 2014).

Durante las últimas décadas se han realizado numerosos progresos para seleccionar antígenos de *Leishmania* como potenciales candidatos vacunales así como los mejores adyuvantes para dichas vacunas (Palatnik-de-Sousa, 2008). La elección del adyuvante juega un papel muy importante en promover una respuesta adecuada frente al antígeno y su reconocimiento por parte del sistema inmunitario (Miró *et al.*, 2008). Algunos adyuvantes no son adecuados en perros, por ejemplo el bacilo vivo de Calmette y Guérin (BCG) se ha empleado con éxito experimentalmente junto con proteínas recombinantes de *Leishmania*, pero produce grandes abscesos tras su aplicación por vía s.c. en perros (Poot *et al.*, 2009).

En perros se han investigado cuatro tipos de vacunas a base de: parásitos muertos (Gavгани *et al.*, 2002b; Mohebalí *et al.*, 2004; Giunchetti *et*

al., 2008a), antígenos purificados (Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Lemesre *et al.*, 2005; 2007; Moreno *et al.*, 2014b), antígenos recombinantes (Gradoni *et al.*, 2005) y de ADN (Rafati *et al.*, 2005; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007b).

Las vacunas también se pueden dividir en vacunas de primera generación (parásitos vivos), de segunda generación (antígenos purificados de *Leishmania* o bacterias recombinantes vivas expresando antígenos de *Leishmania*) y de tercera generación (antígenos codificados en plásmidos de ADN) (Foroughi-Parvar y Hatam, 2014; Rezvan y Moafi, 2015).

La mayoría de los veterinarios en el sur de Europa recomiendan el uso de vacunas seguras y eficaces como medida preventiva en perros en áreas endémicas (96,5%), que se trasladan a áreas endémicas (96,5%) o combinadas con otras medidas profilácticas (94,2%) (Bourdeau *et al.*, 2014).

2.5.2.2.1. Vacunas de primera generación:

Las vacunas con parásitos vivos o atenuados se han considerado poco seguras y las vacunas con parásitos muertos han demostrado escasa protección (Gradoni, 2001).

Las vacunas vivas consisten en promastigotes vivos virulentos cultivados *in vitro* e inoculados intradérmicamente en zonas del cuerpo no visibles (McCall *et al.*, 2013). Las personas que se recuperan de la leishmanización son inmunes a la infección natural. Sin embargo, no se evita que aparezca una lesión en el punto de inoculación, y en una amplia parte de la población se producen lesiones graves, que pueden requerir tratamiento. Por ello, esta práctica ha sido abandonada, excepto en Uzbekistán, único país donde todavía se realiza (Noazin *et al.*, 2008).

Las vacunas vivas atenuadas presentan la ventaja de simular una infección natural, pero avirulenta, facilitando la estimulación de la respuesta

inmune de memoria (Silvestre *et al.*, 2008). Las vacunas vivas de *Leishmania* atenuadas que se han estudiado incluyen: 1) Aislados avirulentos, como *L. tarentolae*, que induce una inmunidad cruzada con las especies patógenas (Breton *et al.*, 2005), 2) Parásitos atenuados mediante pases en cultivo *in vitro* (Mitchell *et al.*, 1984), selección por sensibilidad a la temperatura (Gorczynski, 1985), a la irradiación gamma (Rivier *et al.*, 1993) o mutagénesis química (Kimsey *et al.*, 1993), 3) Parásitos modificados genéticamente.

Convit *et al.* (1987) fueron los pioneros en el uso de BCG como coadyuvante de parásitos muertos. Mohebalí *et al.* (2004) obtuvieron una eficacia del 69% con una vacuna basada en precipitados de *L. major* autoclavados en hidróxido de aluminio y BCG. La vacuna se consideró segura y bien tolerada, con excepción de una úlcera en el punto de inoculación presente en el 64,5% de los perros.

2.5.2.2.2. Vacunas de segunda generación

- Antígenos brutos de parásitos completos

La vacuna LBSap, compuesta de antígenos brutos de *L. braziliensis* y saponina como adyuvante ha demostrado ser altamente inmunogénica y promover una respuesta inmunitaria humoral y celular persistente frente a la infección por *L. infantum* en perros (Roatt *et al.*, 2012). En este estudio llevado a cabo en Brasil, se incluyeron 20 perros separados en 4 grupos, de manera que se inyectó por vía s.c., respectivamente, PBS, proteína de *L. braziliensis*, saponina y LBSap, 3 veces durante 4 semanas. 105 días después, se infectó intradérmicamente a los perros con promastigotes de *L. infantum* y extracto de las glándulas salivales de *L. longipalpis*. Los perros vacunados con LBSap desarrollaron un aumento de las IgG específicas anti-*Leishmania* (subclases IgG1 e IgG2), de las células T4 y T8 y de los niveles de IFN- γ en el bazo. A su vez, la carga parasitaria en el bazo disminuyó significativamente.

Resultados similares se han observado en otros estudios con la misma vacuna (Vitoriano-Souza *et al.*, 2013). Se trata de una vacuna segura en perros, no ocasionando úlceras en el punto de inoculación (Giunchetti *et al.*, 2007; Vitoriano-Souza *et al.*, 2008).

- Vacunas de fracciones purificadas

Las vacunas basadas en antígenos purificados son las que han dado mejores resultados. Estas vacunas están formadas únicamente por fracciones de *Leishmania* purificadas en el laboratorio. Su principal ventaja es la ausencia de partes del parásito que pueden exacerbar la enfermedad en lugar de conferir protección. La mayoría de estas moléculas protectoras se localizan en la superficie del parásito. Dentro de este grupo se encuentran dos vacunas que han sido aprobadas para su uso en la Lcan:

- CaniLeish[®] (Virbac Animal Health, Francia): ha sido la primera vacuna aprobada por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) en Europa. Consiste en proteínas purificadas de excreción-secreción de *L. infantum* (LieSAP – *L. infantum* excreted antigen promastigote), junto con saponina QA-21 como adyuvante (una fracción altamente purificada de saponina *Quilaja saponaria*) (Moreno *et al.*, 2014b). Se desarrolló en Francia, empleando el dipéptido muramil (MDP) como adyuvante (Lemesre *et al.*, 2005; Bourdoiseau *et al.*, 2009).

La vacuna se administra en perros seronegativos y mayores de 6 meses en tres inyecciones subcutáneas, con un intervalo de tres semanas y una dosis anual de recuerdo. Ha demostrado ser es muy inmunógena en perros, produciendo una respuesta humoral predominantemente de tipo IgG2 e induce una respuesta celular fuerte de tipo Th1 de un año de duración, estimulando la capacidad leishmanicida de los macrófagos (Moreno *et al.*, 2012; 2014b).

Martin *et al.* (2014) observaron que el riesgo de progresión hacia una infección activa se redujo en perros vacunados con CaniLeish[®], y sin recibir ninguna dosis anual de recuerdo, un año tras ser infectados por vía i.v. con promastigotes de *L. infantum*. A su vez, la carga parasitaria en MO fue menor que en los perros del grupo control. En ensayos de campo, su eficacia se demostró exponiendo 90 perros a la infección natural por *L. infantum* durante dos épocas consecutivas de transmisión en dos regiones endémicas (46 vacunados y 44 controles). Se redujo significativamente el riesgo de progresión hacia la infección activa, con una eficacia clínica del 68,4% y una tasa de protección del 92,7%. Se estudió la probabilidad de que un perro resultara positivo mediante PCR a partir de aspirados de tejidos, siendo similar entre los grupos, aunque en el grupo de perros vacunados la probabilidad de volver a un resultado negativo de PCR fue mayor (Oliva *et al.*, 2014).

El poder infectante de los perros vacunados es menor, como se ha demostrado mediante xenodiagnóstico con *P. perniciosus* (Bongiorno *et al.*, 2013). Sin embargo, son necesarios más estudios con mayor número de animales y de diversas edades y razas.

Mientras que en la mayoría de los estudios publicados no se han descrito efectos adversos locales ni sistémicos tras la vacunación en perros (Martin *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2014b), Oliva *et al.* (2014) describen algunos casos de alopecia transitoria focal en el punto de inoculación.

- Leishmune[®] (Zoetis): comercializada en Brasil en el año 2004, ha sido la primera vacuna aprobada para la inmunoprofilaxis de la Lcan (Borja-Cabrera *et al.*, 2002). Se trata de una fracción enriquecida de la glicoproteína de superficie GP63 de *L. donovani*, denominada FML

(ligando fucosa-manosa) con saponina QuilA como adyuvante. La pauta de vacunación consiste en tres dosis iniciales con un intervalo de tres semanas y una revacunación anual.

Los estudios de campo realizados revelan que esta vacuna presenta una eficacia del 76-80% y una protección del 92-95% (Borja-Cabrera *et al.*, 2002; 2008). Nogueira *et al.* (2005) demostraron la ausencia del parásito y de signos clínicos en los animales vacunados. La vacuna ha resultado ser inmunógena, segura y protectora a largo plazo en estudios clínicos de fase III (Borja-Cabrera *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2000). Además, los perros vacunados resultan positivos al test DTH en un periodo de dos (da Silva *et al.*, 2000) y siete meses (Borja-Cabrera *et al.*, 2002). Leishmune[®] es un estimulador selectivo de los fagocitos, induce la producción de IFN- γ e IL-4, así como de niveles elevados de IgG1 anti-*Leishmania* y LT CD8+ (Araújo *et al.*, 2008; 2011). Además, la naturaleza purificada del antígeno FML promueve una activación selectiva de las células de la respuesta inmune innata (Araújo *et al.*, 2008). Marcondes *et al.* (2011b) observaron una primera elevación de anticuerpos 48 días tras la última vacunación, manteniéndose unos niveles altos de anticuerpos durante seis meses.

Con las técnicas serológicas estándar existe una reacción cruzada entre los anticuerpos de los animales vacunados y de los animales con infección natural (Marcondes *et al.*, 2011b). En este contexto, Marcondes *et al.* (2013) comparando varias técnicas serológicas observaron que la técnica de ELISA indirecto *in house* fue la que detectó más perros seropositivos (100% a los 42 y 90 días post-vacunación y 88,8% a los seis meses post-vacunación), pero no discrimina anticuerpos de infección de anticuerpos vacunales.

El adyuvante de esta vacuna, la saponina, potencia su eficacia, pero puede causar efectos secundarios como anorexia, astenia, fiebre, vómitos, diarrea o reacciones cutáneas adversas en el punto de inoculación (dolor, inflamación, alopecia, necrosis) (Parra *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2014).

Algunos autores describen cómo en perros enfermos la vacuna es capaz de bloquear la transmisión de la infección (Dantas-Torres, 2006; Saraiva *et al.*, 2006) y hay estudios que revelan que esta vacuna podría utilizarse como inmunoterapia en la Lcan (Santos *et al.*, 2007) y Borja-Cabrera *et al.* (2010) observan mejores resultados cuando se combina con quimioterapia, aunque parece prematuro su uso en perros enfermos.

- Vacunas de proteínas recombinantes

Estos antígenos producen una fuerte protección pero de menor duración por pérdida de inmunogenicidad, debido a que su conformación puede cambiar respecto a la proteína original con la posible pérdida de conformación de epítomos (Coler y Reed, 2005). En general, estas vacunas necesitan administrarse con adyuvantes para poder generar una respuesta Th1 (Coler y Reed, 2005; Poot *et al.*, 2009).

- LeishTec[®], Hertape Calier: esta vacuna, a base del antígeno recombinante A2 y saponina como adyuvante, se aprobó para su uso frente a la Lcan en Brasil tras realizar un estudio con perros infectados experimentalmente (7 vacunados y 7 controles). La protección frente a la infección, evaluando cultivos de *Leishmania* en aspirados de tejidos, fue del 40% (Fernandes *et al.*, 2008). Además, se observó un incremento en los niveles de IgG total e IgG2, así como de IFN- γ . La pauta de vacunación es de tres dosis con un intervalo de tres semanas y revacunación anual.

Fernandes *et al.* (2014) describen en el 13% de los perros vacunados reacciones adversas sistémicas (apatía, anorexia e hiporexia) y locales (dolor, edema y nódulos inflamatorios de hasta cinco días de duración), así como la presencia de parásitos en el bazo del 7,9% de perros y una capacidad infectante en el 5,4% de los animales.

Actualmente, LeishTec[®] es la única vacuna disponible en Brasil ya que Leishmune[®] ha sido retirada del mercado en octubre de 2014 (datos sin publicar).

- La proteína quimera “Q” está formada por la fusión génica de 5 fragmentos antigénicos intracelulares a partir de proteínas ribosomales ácidas y la histona H2A (Soto *et al.*, 1998). La administración intraperitoneal de esta proteína “Q” junto con el adyuvante BCG demostró protección en perros tras ser infectados experimentalmente con *L. infantum* con una eficacia del 90% (Molano *et al.*, 2003). También se ha observado que una única inyección en perros vía s.c. de la proteína “Q” sin adyuvantes, induce una reducción en la carga parasitaria así como protección clínica frente a la infección por *Leishmania* (Carcelén *et al.*, 2009). Por el contrario, en otro estudio ninguno de los candidatos vacunales fue capaz de prevenir el establecimiento de la infección ni la aparición de signos clínicos, a pesar de haber inducido una respuesta inmune celular (Poot *et al.*, 2009).
- La combinación del antígeno recombinante MML con dos adyuvantes diferentes fracasó en demostrar eficacia previniendo el establecimiento y la progresión de la enfermedad (Gradoni *et al.*, 2005). En cambio, los estudios realizados en Brasil han detectado una eficacia terapéutica del 75% a los 36 meses post-vacunación (Trigo *et al.*, 2010).

2.5.2.2.3. Vacunas de tercera generación

Más recientemente, el avance de la biotecnología ha permitido el desarrollo de vacunas de ADN que consisten en la inserción del gen que codifica la proteína de interés vacunal en un plásmido bacteriano, el cual se inocula al individuo para que éste exprese las proteínas *in vivo* (Wolff *et al.*, 1990). El ADN plasmídico actúa como vehículo y adyuvante activando a los LB, la producción de citoquinas y la respuesta inmune innata, mediante el TLR9 (Krieg, 2002). De esta forma poseen las ventajas de las vacunas vivas pero sin el riesgo de provocar la infección.

En comparación con las vacunas basadas en antígenos recombinantes, las vacunas de ADN son mucho más estables, al no necesitar cadena de frío, ser baratas y poder combinarse varios genes en un solo candidato vacunal (Palatnik-de-Sousa, 2008; 2012).

Sin embargo, no se ha conseguido la eficacia profiláctica deseada frente a la infección por *L. infantum*, como demuestra el estudio llevado a cabo por Rodríguez-Cortés *et al.* (2007b) en el que si inmunizó intradérmicamente a perros sanos con la mezcla de un plásmido multiantigénico codificando cuatro proteínas de *L. infantum* (Gp63, LACK, KMP-11 y TRYP). Tras su infección experimental un mes después, la mayoría de los perros presentaban signos clínicos evidentes de la enfermedad a los 3-4 meses.

En otro estudio con un modelo de infección experimental de Lcan, se evaluaron dos vacunas basadas en vectores poxvirus expresando la proteína LACK de *L. infantum* en la primovacunación y en la dosis de recuerdo. Se obtuvo una tasa de protección del 62,5% mediante estimulación de la respuesta inmune Th1, no observándose signos clínicos a los 290 días post-vacunación. (Ramos *et al.*, 2008).

Actualmente, se ha conseguido mejorar la eficacia de las vacunas ADN mediante la estrategia de vacunación-revacunación (“prime-boost”) heteróloga. Consiste en la vacunación (prime) con un vector que contiene el gen de interés y la revacunación heteróloga (“heterologous boost”) con un vector diferente al primero pero que contiene el mismo gen o antígeno. Este método ha mejorado la inmunogenicidad de las vacunas ADN, ya que induce una respuesta celular CD4+ y CD8+ y selecciona los LT específicos del antígeno introducido (Woodland, 2004). Se han estudiado diversos tipos de vectores y antígenos para la vacunación-revacunación frente a la leishmaniosis. En un ensayo realizado en perros a los que se administró una vacuna recombinante basada en un plásmido portador de un gen para la expresión del antígeno LACK, seguida de una segunda dosis de recuerdo vehiculada en el virus vaccinia recombinante que contenía el mismo gen, se obtuvo una eficacia de protección del 60% después de 17 meses de seguimiento (Ramiro *et al.*, 2003).

La inclusión de antígenos de la “saliva” del vector en las vacunas anti-*Leishmania* en perros, aumenta su eficacia protectora frente a Lcan, ya que dichos antígenos han demostrado ser muy inmunógenos en el modelo murino (Gomes *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008). Tras la vacunación “prime-boost” en perros con las proteínas LIL143 y LJM17 de *L. longipalpis*, se induce una respuesta Th1 con producción de IFN- γ , así como la actividad leishmanicida de los macrófagos *in vitro* (Collin *et al.*, 2009).

A pesar de haberse logrado numerosos avances en las vacunas para el control de la leishmaniosis, aún existen numerosos factores que limitan su progreso hacia el desarrollo de vacunas eficaces y universales. Entre ellos se incluyen la gran diversidad genética de los parásitos, la dificultad de encontrar marcadores de resistencia en hospedadores inmunizados y la falta de sistemas de infección experimental prácticos que simulen el natural

(Gradoni, 2015). Además, hay que considerar que la valoración de la eficacia clínica de una vacuna en condiciones de campo conlleva años y se necesita un elevado número de perros.

2.5.2.3. La eutanasia en perros como medida de control

El uso de esta práctica (*dog culling*) con el fin de controlar la leishmaniosis humana comenzó en Palestina, China y la Unión Soviética (Costa, 2011). Concretamente en China, donde *L. donovani* y *L. infantum* son responsables de la LV antroponótica y zoonótica, respectivamente (Lu *et al.*, 1994), se realizó un gran esfuerzo para combinar simultáneamente el tratamiento masivo de personas infectadas, el control ambiental del vector con DDT y la eliminación de perros. Con las dos primeras estrategias se consiguió interrumpir la transmisión antroponótica, de forma que en los años 70 los casos de LV en humanos eran infrecuentes en China (Costa, 2011). Sin embargo, en 2008 se produjo un brote de LV, lo que demuestra que la enfermedad nunca fue erradicada y la eutanasia masiva no es eficaz (Otranto y Dantas-Torres, 2013).

En Brasil, donde el control de la Lcan se ha basado desde la década de 1950 en la eutanasia de los perros seropositivos, se sacrifican cada año miles de perros y la incidencia humana anual se estima en 3.500 casos (Dantas-Torres *et al.*, 2012), siendo responsable del 90% de los casos de LV zoonótica a nivel mundial (Alvar *et al.*, 2012). A pesar de no estar aprobada por razones éticas en Brasil (Costa, 2011), las autoridades de salud pública continúan recomendando esta medida. La ineficacia de una técnica tan poco ética está demostrada por la tendencia creciente de los casos de LV zoonótica entre los años 1990 y 2010 en Brasil (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

Ya que la eutanasia de los perros se basa únicamente en resultados de serología, los perros vacunados pueden ser sacrificados por una mala

interpretación del diagnóstico, y por tanto, deberían incluirse las técnicas moleculares para proporcionar un diagnóstico más preciso y evitar la eutanasia de perros no infectados (de Oliveira Mendes *et al.*, 2003; Marcondes *et al.*, 2013).

Además, Costa *et al.* (2013), han demostrado mediante xenodiagnóstico que algunos perros inoculados intradérmicamente con *L. infantum* junto con glándulas salivales de *L. longipalpis* con serología positiva no fueron infectantes para los flebotomos.

Las razones por las que esta estrategia fracasa incluyen:

- Otros animales actúan como reservorios de *L. infantum* (p.e. marsupiales, roedores y los propios humanos) (Quinnell y Courtenay, 2009).
- Los estudios de *L. infantum* en las poblaciones de perros basados exclusivamente en la serología son poco precisos (Silva *et al.*, 2011).
- El reemplazo rápido de los perros eutanasiados por perros jóvenes incrementa la proporción de animales susceptibles en la población (Nunes *et al.*, 2008).

2.5.2.4. Manejo de perros clínicamente sanos en áreas endémicas

El hecho de encontrar ADN de *Leishmania* en la sangre y otros tejidos de perros clínicamente sanos en áreas endémicas solo indica infección, pero puede que nunca desarrollen enfermedad (Oliva *et al.*, 2006). Por el contrario, hallar un título elevado de anticuerpos suele corresponderse con la diseminación de la infección y un futuro desarrollo de la enfermedad (Reis *et al.*, 2006c; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Consecuentemente, se debería realizar la detección de anticuerpos en perros residentes en áreas endémicas

de Lcan al menos cada 6-12 meses, con el fin de instaurar las correctas medidas terapéuticas y preventivas (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Los perros clínicamente sanos pero con títulos elevados de anticuerpos deberían tratarse como perros enfermos, mientras que a los perros con títulos bajos y clínicamente sanos debería realizarse un seguimiento clínico y serológico cada tres-cuatro meses durante un año, y posteriormente cada 6-12 meses, ya que la manifestación clínica de la enfermedad puede tardar hasta años en aparecer (Oliva *et al.*, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

2.6. IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA

Los perros son los principales reservorios domésticos de la infección por *L. infantum*, razón por la cual han sido el principal objetivo en la mayoría de los programas de control en diversos países. Aunque la Lcan se considera endémica en varios países, principalmente en América del Sur y en la cuenca mediterránea, a día de hoy no existe una estimación precisa de su actual distribución y prevalencia.

El hecho de que haya un perro infectado en una vivienda no parece incrementar mucho el riesgo de infección a la familia cuando la transmisión está presente en el área en la que se encuentran. Por lo tanto, los propietarios de perros con leishmaniosis poseen un riesgo bajo de infectarse por medio de su propio perro (Solano-Gallego *et al.*, 2009). En general, los casos de LV humana se describen en zonas donde la Lcan es hiperendémica (Papadopoulou *et al.*, 2005).

El creciente aumento de la incidencia de Lcan en países donde no es endémica supone un reto para los propietarios de perros, los veterinarios y las autoridades sanitarias. En ausencia de medidas profilácticas, la introducción de perros infectados en áreas previamente libres de Lcan y

con la presencia de vectores competentes, puede resultar en el establecimiento persistente de *L. infantum* (Maia y Cardoso, 2015).

Las predicciones sobre el cambio climático sugieren la posibilidad de que se establezcan nuevas infecciones por *L. infantum* en determinadas zonas del norte y centro de Europa. Por consiguiente, la vigilancia de hospedadores vertebrados infectados por *Leishmania*, así como de los patrones de distribución de flebotomos en regiones con condiciones climáticas más favorables en Europa, es crucial (Dujardin *et al.*, 2008; Ready, 2010).

2.6.1. Brote de leishmaniosis humana en la Comunidad de Madrid

En la Comunidad de Madrid, la leishmaniosis es una enfermedad de declaración obligatoria en humanos desde 1997, detectándose en la última década entre 12 y 25 casos anuales (Aránguez *et al.*, 2014).

A finales de 2010 los sistemas de vigilancia en Salud Pública detectaron un brote de leishmaniosis humana en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid en cuatro municipios cercanos entre sí (Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid) que comparten amplios espacios de parques (Vilas *et al.*, 2012). Se analizaron 485 casos que cumplían los criterios de definición de brote, con una tasa de incidencia de 21,1 casos/100.000 habitantes. El 36,5% de los casos presentaron una forma visceral, mientras que el 63,5% restante una forma cutánea. El rango de edad osciló entre 2 meses y 95 años, el 15% de los casos eran ciudadanos extranjeros, el 9,9% pacientes con inmunosupresión y el 9,3% menores de 5 años (Aránguez *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos en 2012 a través de la prueba serológica rK39, llevada a cabo en perros de perreras, rehalas, explotaciones ganaderas

o que acudieron a la vacunación antirrábica, mostraron una prevalencia no superior al 2%, no siendo mayor a los de años anteriores, por lo que no permitían explicar por sí mismos el brote en humanos (Vilas *et al.*, 2012). Se investigaron otros posibles reservorios, como liebres, conejos, gatos y ratas, hallándose prevalencias mediante PCR del 7,2% en gatos (procedentes de colonias y asilvestrados), 1,5% en conejos y 29% en liebres (Vilas *et al.*, 2012) y se detectaron anticuerpos frente a *L. infantum* en el 9,3% de los gatos, el 45,7% de los conejos y el 74,1% de las liebres (Moreno *et al.*, 2014a).

La elevada prevalencia hallada en liebres, junto con los ensayos de xenodiagnóstico llevados a cabo en siete liebres seropositivas capturadas en la zona de estudio, de las cuales cuatro fueron capaces de infectar a *P. perniciosus* (57,14%), finalmente confirmaron el papel de la liebre como reservorio alternativo (Molina *et al.*, 2012). Este hallazgo pone de manifiesto la existencia de un nuevo ciclo de transmisión silvestre de *L. infantum* de carácter periurbano.

Las causas del brote se atribuyen a la transformaciones urbanísticas llevadas a cabo en la última década que han modificado la ecología de las liebres, pasando de un ciclo selvático a otro urbano, viéndose favorecidas por la falta de competidores como rapaces o jabalíes y su buena adaptación al medio (Vilas *et al.*, 2012).

En este brote se tomaron medidas de control en el reservorio, el medio ambiente y el vector:

- a. Control del reservorio: se instauró un plan de control de poblaciones de liebres y conejos mediante capturas con redes, la participación de galgos y aves de cetrería, y la eliminación de madrigueras que pudieran constituir un hábitat idóneo para la multiplicación del vector (Vilas *et al.*, 2012).

- b. Control de los flebotomos: en la época de actividad del vector (abril-octubre) se pusieron trampas de luz y adhesivas convencionales (Arce *et al.*, 2013). El 63,1% de los ejemplares encontrados fueron *P. perniciosus*, con una densidad media elevada en las zonas de estudio, con 45,3 flebotomos/m², frente a los 20 de media de la Comunidad de Madrid (Vilas *et al.*, 2012). El plan de lucha antivectorial consistió en la desinsectación mediante tratamientos periódicos con insecticidas biológicos y piretroides (en espolvoreo o nebulización) de los municipios afectados, incluyendo escombreras, vertederos, parques y la red de alcantarillado y de recogida de aguas pluviales (Vilas *et al.*, 2012; Arce *et al.*, 2013).
- c. Control medioambiental: en las zonas de riesgo se procedió a eliminar restos vegetales, madrigueras de roedores y lagomorfos, escombreras y limpieza de parcelas, parques, redes de alcantarillado y desbroces. A su vez, se intensificó la recogida de animales abandonados (Vilas *et al.*, 2012; Arce *et al.*, 2013).
- d. En materia de comunicación, se llevó a cabo una importante campaña de información a través de la comunicación y educación sanitaria de las ciudadanías y los profesionales de la salud.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVO

L. infantum es un parásito cosmopolita y se considera endémico en más de 70 países de todo el mundo, en los que el perro actúa como el principal reservorio del parásito tanto para los humanos como para otros animales. El diagnóstico de la Lcan es fundamental para diferenciar animales enfermos de portadores subclínicos. Sin embargo, debido al carácter inmunomediado de la enfermedad y al amplio rango de manifestaciones clínicas y alteraciones clínicopatológicas, el diagnóstico es difícil, y requiere la combinación de diferentes técnicas, fundamentalmente a partir de muestras obtenidas de manera invasiva. En lo que respecta a la quimioterapia de la Lcan, en los estos últimos años ha habido pocos avances destacables. Aunque los protocolos de tratamiento y seguimiento clínico han evolucionado notablemente, hoy en día no existe ningún principio activo que consiga una curación parasitológica ni que impida la aparición de recidivas.

En la presente Tesis Doctoral se han definido tres objetivos principales:

1. Demostrar la presencia de *L. infantum* en un modelo experimental canino a lo largo de un año post-infección y comparar la carga parasitaria en muestras invasivas y no invasivas.
2. Conocer la eficacia leishmanicida y la tolerancia de la administración intravenosa de una nueva formulación de anfotericina B en estado poliagregado en el tratamiento de la leishmaniosis canina en perros con infección experimental, evaluando la evolución clínica de los animales post-tratamiento.

3. Conocer la eficacia leishmanicida y la tolerancia de la administración oral de una formulación a base de oleilfosfocolina en el tratamiento de la leishmaniosis canina en perros con infección natural, evaluando la evolución clínica de los animales post-tratamiento.

4. PUBLICACIONES

4.1. Objetivo 1: Demostrar la presencia de *L. infantum* en un modelo experimental canino a lo largo de un año post-infección y comparar la carga parasitaria en muestras invasivas y no invasivas.

El amplio abanico de manifestaciones clínicas y alteraciones clínicopatológicas de la Lcan tiene importantes implicaciones en el diagnóstico. En consecuencia, se debe realizar una aproximación diagnóstica integrada, teniendo en cuenta los antecedentes reflejados en la historia clínica, el cuadro clínico, y las pruebas de laboratorio.

Es por tanto fundamental realizar un diagnóstico preciso y rápido de la infección por *L. infantum*. Aunque se han desarrollado numerosas pruebas diagnósticas, aún no se ha llegado a un consenso sobre la técnica “gold estándar” en Lcan (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2011), y es esencial conocer las bases y limitaciones de cada prueba. Las técnicas serológicas pueden presentar reacciones cruzadas con otras enfermedades y conllevan dificultades para detectar anticuerpos en animales infectados clínicamente sanos y en las fases tempranas de la infección (Leontides *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta que los animales sin signos clínicos representan un elevado porcentaje de los perros infectados en áreas endémicas (hasta el 85%) (Dantas-Torres *et al.*, 2006), las técnicas moleculares, en concreto la PCR, aumentan la sensibilidad en el diagnóstico.

Con el fin de facilitar el diagnóstico, tanto desde un punto de vista epidemiológico, como clínico, en los últimos años se están llevando a cabo estudios encaminados a detectar la presencia de ADN de *Leishmania* en muestras obtenidas de manera no invasiva. Hasta el momento, los mejores resultados de sensibilidad y especificidad en la detección de *L. infantum* se han obtenido a partir de hisopos de conjuntiva, incluso en perros con infección subclínica (Leite *et al.*, 2010). Es importante destacar que a pesar

de los importantes avances científicos, aún son muy pocos los estudios sobre la utilización de estas muestras no invasivas en el diagnóstico de Lcan, por lo que son necesarios más estudios que ayuden a esclarecer la utilidad diagnóstica de las mismas.

En el presente estudio se ha realizado el seguimiento post-infección durante un año de ocho perras de raza Beagle infectadas experimentalmente con *L. infantum*, a propósito de un estudio posterior de eficacia terapéutica. Se valoraron mensualmente parámetros clínicos, inmunológicos y parasitológicos. El principal objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *L. infantum* y la carga parasitaria en diferentes muestras obtenidas tanto de manera invasiva (sangre y MO) como no invasiva (orina, hisopos de conjuntiva, mucosa oral y vulvar), en comparación con otras técnicas diagnósticas a lo largo del curso de la infección.

Además, se ha cuantificado por primera vez la carga parasitaria de *L. infantum* en la mucosa vulvar en hembras infectadas.

Publicación científica:

Hernández, L., Montoya, A., Checa, R., Dado, D., Gálvez, R., Otranto, D., Latrofa, M. S., Baneth, G. and Miró, G. (2015). Course of experimental infection of canine leishmaniosis: follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques. *Vet Parasitol*, 207, 149-155.



Short Communication

Course of experimental infection of canine leishmaniosis: Follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques



Leticia Hernández^a, Ana Montoya^a, Rocío Checa^a, Diana Dado^a, Rosa Gálvez^a, Domenico Otranto^b, Maria Stefania Latrofa^b, Gad Baneth^c, Guadalupe Miró^{a,*}

^a Department of Animal Health, Veterinary Faculty, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Department of Veterinary Medicine, University of Bari, 70010 Valenzano, Bari, Italy

^c School of Veterinary Medicine, Hebrew University, P.O. Box 12, Rehovot 76100, Israel

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2014

Received in revised form 30 October 2014

Accepted 31 October 2014

Keywords:

Leishmania infantum

Experimental infection

Dog

Diagnosis

Non-invasive

Real-time PCR

Vulvar swab

ABSTRACT

This study compares the utility of a molecular diagnosis of experimental CanL on non-invasive samples (urine, conjunctival (CS), oral (OS) and vulvar (VS) swabs) with that of traditional invasive techniques during the course of infection. Eight dogs were experimentally infected with *Leishmania infantum* and followed monthly for 12 months to assess clinical, clinicopathological, immunological and parasitological variables. Active infection was produced in 100% of the dogs. The animals showed positive bone marrow (BM) cytologies and cultures, clinical signs, clinicopathological abnormalities and a high specific humoral immune response. The infection was detected at 90 days post-infection (p.i.) by real-time quantitative PCR (rtQ-PCR) on BM in all dogs and in blood in 2 dogs, while anti-*L. infantum* antibody seroconversion occurred between Days 120 and 180 days p.i. The tissue with the highest *L. infantum* kDNA load, as detected by rtQ-PCR, was BM (range 381.5–70,000 parasites/ml at the study end), this sample type showing greater sensitivity than peripheral blood (PB). The vulvar swabs used here for the first time to quantify parasite loads in dogs revealed a greater load than oral and conjunctival swabs at one year p.i. Urine samples showed the lowest concentrations of *L. infantum* DNA (maximum: 8.57 parasites/ml). Our results suggest that for the early detection of infection, adding to serology a test such as rtQ-PCR on OS or VS improves sensitivity and specificity.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Canine leishmaniosis (CanL) caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) is a worldwide zoonosis, present in Europe, Asia, North Africa and South America and more recently also North America (Esch and Petersen, 2013). Dogs are both the natural hosts and main reservoir of

human infection (Alvar et al., 2004; Gramiccia and Gradoni, 2005).

CanL is a systemic disease that may potentially involve any organ, tissue and biological fluid and produces many non-specific clinical signs, making the diagnosis fairly difficult (Foglia Manzillo et al., 2013). Although after treatment clinical signs may improve, parasitological cure is never achieved in dogs and relapses occur frequently (Miró et al., 2008).

For a diagnosis of CanL, parasitological (cultures, cytology or histology, immunohistochemistry), serological

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3943711; fax: +34 91 3943708.
E-mail address: gmiro@ucm.es (G. Miró).

(IFAT, ELISA) and molecular (conventional, nested and real time PCR) procedures are used individually or in combination (Baneth and Aroch, 2008). IFAT is today one of the most commonly used methods for detecting anti-*L. infantum* antibodies (Solano-Gallego et al., 2009; Bourdeau et al., 2014) due to its high sensitivity and specificity (Mancianti et al., 1995). However, epidemiological studies in endemic areas of CanL has shown higher prevalence of infection by means of molecular techniques than seroprevalence (Baneth and Aroch, 2008).

Real-time Q-PCR is able to quantify 0.01–10,000 parasites in a single reaction and detects infection even before seroconversion (Martínez et al., 2011), being an effective tool to diagnose CanL when the dog lacks detectable antibodies, monitor and predicting relapses during follow-up (Hernández et al., 2014; Martínez et al., 2011), with the advantage of speed and reduced risk of sample contamination.

The different biological samples used for PCR detection of *Leishmania* DNA have shown varying degrees of sensitivity. These include samples of bone marrow (BM), lymph node, spleen, skin, peripheral blood (PB), buffy coat and other fluids (Maia et al., 2009; Solano-Gallego et al., 2009). There is still no general consensus regarding the standard sample of choice (Almeida et al., 2013; Lombardo et al., 2012); however, the use of non-invasive sampling techniques could serve to simplify diagnostic procedures, epidemiological studies, field trials, reduce pain and thus would be more readily accepted by owners. The non-invasive samples tested so far have been urine, hair, CS, OS, nasal and ear swabs (Belinchón-Lorenzo et al., 2013; Carvalho Ferreira et al., 2014; Ferreira et al., 2013; Gramiccia et al., 2010; Lombardo et al., 2012; Manna et al., 2008; Muñoz-Madrid et al., 2013; Solano-Gallego et al., 2007).

The main objective was to compare *L. infantum* presence and load data obtained in invasive (PB and BM) and non-invasive samples (urine, CS, OS and VS) with the information provided by other diagnostic techniques throughout the course of infection in 8 Beagle dogs experimentally infected with *L. infantum* during 12 months of follow-up.

2. Material and methods

The experimental animals sampled were eight healthy female intact Beagle dogs (8 months old, body weight 10.5–16.6 kg). Each dog was identified by a microchip and assigned an identification number (1–8). No dog had detectable levels of *Leishmania*-specific antibodies or *Leishmania* DNA in blood.

All dogs had been previously vaccinated against rabies, canine distemper, hepatitis/adenovirus type 2, leptospirosis and parvovirus, and correctly dewormed. The dogs were kept in indoor kennels and fed a standard diet of puppy food pellets with water given ad libitum. The kennel's nested windows were sprayed with deltamethrin to avoid natural *Leishmania* infection. The study protocol followed International guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and Spanish legislation guidelines (RD

1201/2005) and received Ethics Committee approval (Universidad Complutense de Madrid, Spain).

Dogs were experimentally infected with the *L. infantum* MON-1 strain MCRI/ES/06/BCN-721 (i.v. 5×10^7 promastigotes/ml in a total volume of 0.5 ml), kindly provided by Dr. Portús (Universidad Autónoma de Barcelona, Spain).

During the one-year course of infection, the dogs were subjected to monthly physical, clinicopathological, immunological and parasitological exams at 13 time points from Days 0 to 360 postinfection. Samples were collected previous sedation with medetomidine (Domtor®, Pfyzer S.A.) at a dose of 0.02 mg/kg i.v. and Atipamezole (Antisedan®, Pfyzer S.A.) was given for the reversal of sedation at the same dose.

Peripheral blood (5 ml) was collected by cephalic venipuncture to carry out biochemical tests, complete blood counts (CBC), rtQ-PCR *Leishmania* detection and antibody testing (IFAT). Complete blood counts included red blood cell count (RBCC), packed cell volume (PCV), white blood cell count (WBCC), and platelet count. The biochemical variables determined to assess renal and hepatic function were urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total plasma protein, albumin/globulins ratio, and serum protein electrophoresis.

Bone marrow aspirates (0.5 ml) were obtained and cultured on NNN specific medium. An aliquot was stored in 200 µl of buffer NET 10 (NaCl 10 mM, EDTA 10 mM, Tris 10 mM) for DNA extraction. Urine was collected by catheterization for a complete urinalysis in which the urinary protein creatinine ratio (UPC) was monitored. An aliquot of urine (1.5 ml) was stored for DNA extraction. Sterile cotton swabs were used to remove exfoliative cells from the conjunctiva, oral and vulvar mucosae. All samples for DNA purification were stored at -20°C until further analysis.

Each dog was scored monthly for 23 clinical signs assessed in a physical examination using a categorized scoring system from 0 to 3 (from low to high severity), as previously described (Miró et al., 2009), obtaining an overall monthly clinical score (maximum possible score = 52). In a similar way, dogs were scored for 11 clinicopathological variables (CBC, biochemical profile, urinalysis and UPC) using a categorized scoring system from 0 to 2 (maximum possible score of 16).

Anti-*L. infantum* immunoglobulin G (IgG) antibodies were detected by an immunofluorescence antibody test (IFAT) (cut-off $\geq 1/100$) (Mancianti and Meciani, 1988).

The presence of *Leishmania* amastigotes was assessed monthly by microscopy examination of three Giemsa-stained BM smears and BM cultures in biphasic NNN medium (WHO, 2010). Cultures were scored as negative after four consecutive negative results over a 4-week period (Dedet et al., 1999).

The QuiAamp® DNA Micro Kit (50) (QIAGEN®) was used to obtain DNA from peripheral whole blood (100 µl), BM aspirates (100 µl) and urine (800 µl) according to the manufacturer's instructions. For the CS, OS and VS samples the protocol was modified as follows: each swab was re-suspended in 290 µl of lysis buffer ATL, 20 µl of proteinase K and 200 µl of buffer AL (to which "carrier RNA"

had been previously added to increase DNA binding to the eluted column membrane) and incubated at 56 °C for 2 h under agitation to promote protein digestion. Next, after perforating each extreme (bottom and lid), the Eppendorf containing the swabs was placed in another Eppendorf and centrifuged at 3500 r.p.m. for 3 min. 50 µl of ethanol (100%) were then added and mixed for 15 s followed by vortexing and spinning off for 5 s. The final steps were as described by the manufacturer. The extracted DNA was eluted in sterilized water (70 µl) and stored at –20 °C until further use.

L. infantum DNA in tissue samples was detected by rtQ-PCR on D0 (PB), D90 (PB and BM), D120, D270 (PB and BM) and D360 p.i., as described previously (Francino et al., 2006). The rtQ-PCR procedure was carried out in a CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA) and data analyzed with CFX Manager™ Software Version 1.6 (Bio-Rad).

Leishmania kDNA was quantified as described by Dantas-Torres et al. (2011). Results are expressed as absolute numbers of parasites present in 1 ml of PB, BM, urine, or per swab.

Statistical tests were performed using SAS software package version 9.2. The nonparametric Wilcoxon signed rank test was used to compare data between two time points and correlations among the different variables were examined by Spearman's rank correlation analysis (ρ). Significance was set at a p value ≤ 0.05 .

3. Results and discussion

On D120 the first clinical sign observed was lymphadenomegaly. Five dogs presented exfoliative dermatitis (D240: $n=2$; D270: $n=5$) associated with diffuse to general non inflammatory alopecia (D120: $n=3$), which is the most prevalent cutaneous manifestation of CanL (Koutinas et al., 1999; Rodríguez-Cortés et al., 2007; Fernández-Cotrina et al., 2013). After D300 and D360, the main systemic signs of CanL were observed, such as asthenia ($n=2$), splenomegaly ($n=8$), conjunctivitis ($n=5$), generalized muscular atrophy ($n=3$), temporal muscles atrophy ($n=2$), onychogryphosis ($n=5$), alopecia ($n=6$) and planar hyperkeratosis ($n=5$), reflecting the wide spectrum of clinical manifestations produced during natural infection (Hommel et al., 1995). Dogs 2, 3 and 7 progressed to a more advanced clinical state (scoring 23, 17 and 14, respectively on D360).

The hematological, biochemical and urinalysis data revealed that infected dogs manifested the classic alterations observed in naturally infected dogs, including non-regenerative anemia ($n=6$), which is the most common hematological disorder in CanL (Saridomichelakis, 2009). This fact reflects the involvement of BM, which is highly parasitized in clinical CanL. Hematocrits decreased significantly between D120 and D240 ($p=0.015$) and D120, and D360 ($p=0.007$). After D150, three dogs showed thrombocytopenia, which persisted on D360 in half the dogs. Dysproteinemia was present on D120 in three dogs, and all dogs developed hyperproteinemia associated with hypergammaglobulinemia from D210. At one year p.i., total serum proteins ranged from 8.2 to 11.9 g/dl and

γ -globulin was higher than 4 g/dl in six dogs. An inverted albumin/globulins ratio (A/G ratio) associated with hypergammaglobulinemia and hypoalbuminemia was observed in all dogs on D120 (dogs with a lower A/G ratio showed a higher clinical score).

A transient decrease in urine specific gravity (≤ 1010) was detected in 50% of the dogs on D360 and 75% showed transient proteinuria (100–2000 mg/dl) between D180 and D360. Despite no significant differences were detected in the UPC results during the study period, dogs 1 and 3 showed UPC values of above 0.5 on D360 (0.97 and 0.66 respectively).

At the end of the study, overall clinicopathological and clinical scores ranged from 2 to 6 (median = 5.1) and from 4 to 23 (median = 13), respectively. According to these results, all dogs except dogs 1 and 3 were classified as Stage II of clinical leishmaniosis using the clinical staging system proposed by the LeishVet group to manage CanL (Solano-Gallego et al., 2011). Dogs 1 and 3 were proteinuric and were consequently classified as Substage II b (Solano-Gallego et al., 2011).

An intense early humoral response was observed in all dogs (Fig. 1). Seroconversion occurred between D120 and D180, similar to that noted in other trials (Fernández-Cotrina et al., 2013; Rodríguez-Cortés et al., 2007), while others have reported seroconversion on D30–45 (Leandro et al., 2001; Maia et al., 2010). On D360, all dogs showed higher antibody titers (range 1/3200–1/12,800) than those found in other experimental infections, where the method's detection limit was over 1/400 (Rosypal et al., 2005) or 1/640 (Fernández-Cotrina et al., 2013). Although IFAT titers and clinical signs could not be correlated, highest antibody levels (1/12,800) were recorded in the two dogs showing the highest clinical scores, as previously described (Proverbio et al., 2014).

According to both microscopy observations and BM aspiration specimen cultures in NNN medium, the prepatent period was estimated at between D90 and D180 (Table 1). Infection was detected earlier by BM cytology than by BM culture, although both techniques showed the same sensitivity from D180.

Median *Leishmania* parasite loads for each sample analyzed by rtQ-PCR are provided in Fig. 2. The parasite load varied significantly (range 0.22 parasites/ml of urine to 4,800,000 parasites/ml of BM).

Leishmania kDNA was detected in PB samples from dogs 2 and 7 starting on D90 (mean of 32.4 parasites/ml), whereas dogs 1, 4 and 6 were positive on D120 and dogs 3 and 5 on D180. On D360, the higher parasite concentrations were recorded in six dogs, with a median of 1328 parasites/ml (range 381.5–70,000). It has been reported that dogs whose parasitemia range from medium to high or very high positive are sick or eventually will develop leishmaniosis (Martínez et al., 2011).

Bone marrow was the tissue showing the highest parasite concentrations. In effect, BM is usually densely parasitized in infected dogs (Momo et al., 2014) and is the target organ for invasion and multiplication of the parasite, while blood acts as a transport system and not as a reservoir organ (Momo et al., 2014; Quaresma et al., 2009).

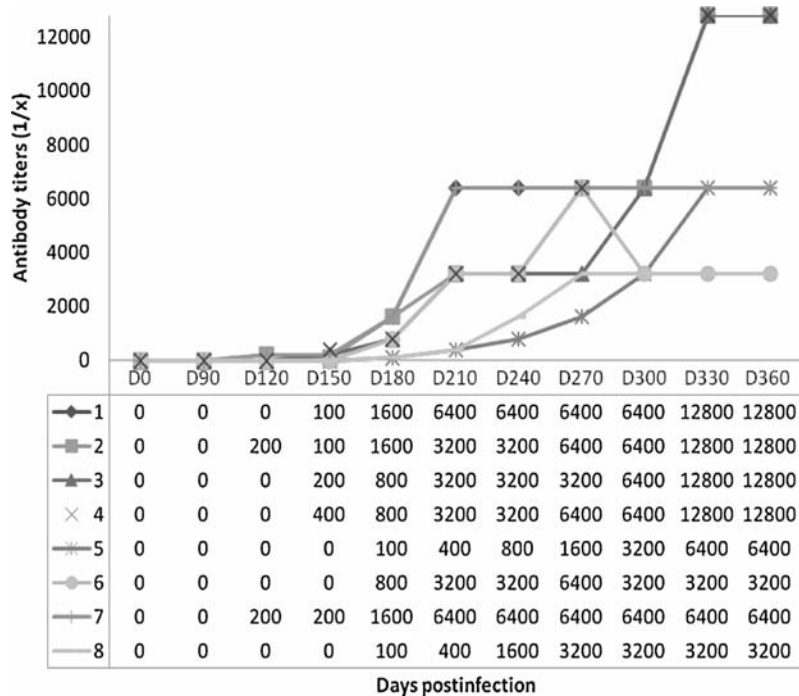


Fig. 1. Anti-*Leishmania* antibody titers determined by IFAT during follow-up postinfection (shaded values indicate seroconversion).

Table 1
Parasite detection in bone marrow aspirates.

Dog	Cytology					Culture				
	D0-D60	D90	D120	D150	D180-D360	D0-D60	D90	D120	D150	D180-D360
1	–	–	+	+	+	–	–	–	–	+
2	–	–	–	+	+	–	–	–	+	+
3	–	+	+	+	+	–	–	–	+	+
4	–	–	–	+	+	–	–	–	–	+
5	–	–	–	+	+	–	–	–	–	+
6	–	–	+	+	+	–	–	–	+	+
7	–	+	+	+	+	–	–	–	–	+
8	–	–	+	+	+	–	–	–	–	+

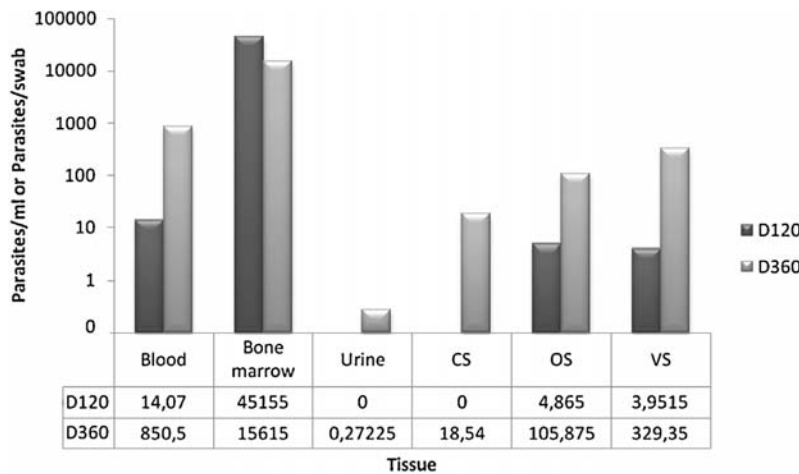


Fig. 2. Median parasite loads determined in swabs samples on D120 and D360 post *L. infantum* infection. CS: conjunctival swab, OS: oral swab, VS: vulvar swab, D120: 120 days post-infection, D360: 360 days post-infection

Accordingly, blood is not the sample of choice for a molecular diagnosis of CanL (Miró et al., 2008). Further, blood may contain a number of PCR inhibitors that can reduce the sensitivity of this technique (Lachaud et al., 2002). Parasite kDNA was detected in BM in six dogs on D90 (118,000 parasites/ml were detected in dog 4), while the remaining two dogs (5 and 8) were positive one month later (D120). The parasite load in this tissue was much higher than that found in PB. However, in a similar experimental CanL study (Rodríguez-Cortés et al., 2007), rtQ-PCR detected parasites in blood in five out of six dogs after D120, while in BM, no parasites were detected in two dogs throughout the study, although the remaining four dogs showed 100 to 5000-fold greater parasite burdens than those observed in blood samples.

On D120, no *Leishmania* kDNA was detected in the urine of any dog, but on D360, six dogs showed low parasite loads (maximum 8.57), while dogs 4 and 8 remained negative. The presence of *L. infantum* DNA in urine has been reported in naturally infected dogs (Franceschi et al., 2007; Manna et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2007) though parasite levels were lower than in BM, lymph node or blood samples. Solano-Gallego et al. (2007) and Manna et al. (2008) correlated renal disease in dogs with the presence of *Leishmania* DNA in urine detected by rtQ-PCR, however, Franceschi et al. (2007) did not observe this link using conventional PCR. In our study, the parasite load found in urine was much lower than that quantified by Solano-Gallego et al. (2007) and Manna et al. (2008), what may be attributed to the fact that 17% and 30%, respectively, of dogs used in the above-mentioned studies had renal disease. In our study, no dog showed clinicopathological signs, nor proteinuria (UPC > 1) compatible with renal disease. Thus in principle, we could say that urine is not a good target tissue for a diagnosis of clinical CanL, especially in dogs without kidney disease, though perhaps its prognostic value for an early diagnosis of renal disease associated with CanL should be addressed.

Exfoliative cells are constantly generated in mucosae, thus the noninvasive collection of this tissue using a swab is a source of biological material for the detection and quantification of *L. infantum*. In our study, a higher parasite load was detected in the vulvar mucosae, followed by the oral and conjunctival mucosae. No kDNA was found in any dog on D60, and only 2 dogs returned positive CS samples three months later (D120), while OS and VS from six dogs were positive at this time-point. In all the dogs except dog 8, *Leishmania* kDNA was present on D360 in CS (range 0.25–384 parasites/swab), OS (range 0.6–1060 parasites/swab) and VS (range 2–3321 parasites/swab).

In our study, the use of OS showed greater sensitivity than PB, urine or CS. By D360, with higher parasite loads (dog 4: 1060 parasites/swab) than previously reported results (Lombardo et al. (2012): mean = 7 parasites/swab). While Lombardo et al. (2012) obtained a low sensitivity of rtQ-PCR in seropositive dogs (8.7%), Ferreira et al. (2013) described the good diagnostic power of OS in the absence of clinical signs, testing 79% of dogs positive by conventional PCR.

In the present study, *Leishmania* parasite loads in dogs were quantified for the first time in vulvar swabs. In a prior trial, an infected bitch was found to show intracytoplasmic amastigotes within an inflammatory cutaneous infiltrate of macrophages in the vulva which was confirmed by immunohistochemistry and PCR (Silva et al., 2008). Throughout our study period, no dogs exhibited vulvar mucosal lesions, although a higher parasite load was detected in this tissue compared to CS, OS and urine. This fact highlights the important epidemiological role of infected females in the sexual transmission of CanL as well as the utility of this tissue for diagnosing *L. infantum* infection.

Conjunctival swabs have offered promising results for a noninvasive molecular diagnosis of CanL including a high sensitivity (over 90%) (Carvalho Ferreira et al., 2014; Strauss-Ayali et al., 2004) and specificity (100%) (Strauss-Ayali et al., 2004) even in seronegative (Leite et al., 2011) and clinically healthy dogs (Carvalho Ferreira et al., 2014). Amastigotes can reach the ocular region via the bloodstream (Reithinger et al., 2002) and most likely also via the lymphatic tissue of the conjunctiva (Strauss-Ayali et al., 2004). According to our results, in all dogs *Leishmania* kDNA was detected in CS on D360, though parasite loads were lower than those observed in OS and VS. Low parasite loads in the conjunctiva have been described by others (Ferreira et al., 2013; Lombardo et al., 2012) and it is thought that amastigotes reach the conjunctival epithelium and persist in a small number of infiltrating macrophages (Strauss-Ayali et al., 2004). Some authors claim that the use of bilateral samples (obtained from both eyes) increases the sensitivity of the assay (Ferreira et al., 2013; Lombardo et al., 2012) despite no significant differences observed compared to sampling both eyes separately. In our study, positive correlation was detected between overall clinical score and the rtQ-PCR results for CS ($p=0.016$ and $\rho=0.8$).

No parasites were detected in PB, urine and vulva in dog 8 throughout the study period, also showing the lowest parasite load in all tissues tested.

The information provided by PCR should not be separated from data obtained in clinical status, clinicopathological and serological assessments, since PCR does not reveal immunological status and a single positive result by this technique confirms *Leishmania* infection but not disease (Solano-Gallego et al., 2009).

An ever-increasing number of studies has detected and quantified the presence of *L. infantum* DNA in samples obtained by non-invasive procedures. While the vast majority focus on natural infections, our study examines experimentally infected dogs, such that we were able to monitor parasite loads in the tissues analyzed during the course of a whole year. We were also able to show for the first time, the presence of *L. infantum* DNA in cells of the vulva and its high burden in some dogs. We therefore recommend the use of vulvar swabs in the diagnosis of CanL, although further work is needed in a larger number of dogs and under natural conditions to confirm this finding.

References

- Almeida, A.B., Sousa, V.R., Gasparetto, N.D., da Silva, G.F., Figueiredo, F.B., Dutra, V., Nakazato, L., Madeira, M.F., 2013. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88.
- Baneth, G., Aroch, I., 2008. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet. J.* 175, 14–15.
- Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Parejo, J.C., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Soto, M., Alonso, C., Gómez Nieto, L.C., 2013. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 192, 43–50.
- Bourdeau, P., Saridomichelakis, M.N., Oliveira, A., Oliva, G., Kotnik, T., Gálvez, R., Foglia Manzillo, V., Koutinas, A.F., Pereira da Fonseca, I., Miró, G., 2014. Management of canine leishmaniasis in endemic SW European regions: a questionnaire-based multinational survey. *Parasit. Vectors* 7, 110.
- Carvalho Ferreira, A.L., Carregal, V.M., de Almeida Ferreira, S., Leite, R.S., de Andrade, A.S., 2014. Detection of *Leishmania infantum* in 4 different dog samples by real-time PCR and ITS-1 nested PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 78, 418–421.
- Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Otranto, D., 2011. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit. Vectors* 4, 56.
- Dedet, J.P., Pratlong, F., Pradinaud, R., Moreau, B., 1999. Delayed culture of *Leishmania* in skin biopsies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 673–674.
- Esch, K.J., Petersen, C.A., 2013. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 58–85.
- Fernández-Cotrina, J., Iniesta, V., Belinchón-Lorenzo, S., Muñoz-Madrid, R., Serrano, F., Parejo, J.C., Gómez-Gordo, L., Soto, M., Alonso, C., Gómez-Nieto, L.C., 2013. Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniasis by *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 192, 118–128.
- Ferreira, S.e.A., Almeida, G.G., Silva, S.e.O., Vogas, G.P., Fujiwara, R.T., de Andrade, A.S., Melo, M.N., 2013. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral Leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2150.
- Foglia Manzillo, V., Di Muccio, T., Cappiello, S., Scalone, A., Paparcone, R., Fiorentino, E., Gizzarelli, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., Oliva, G., 2013. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2225.
- Franceschi, A., Merildi, V., Guidi, G., Mancianti, F., 2007. Occurrence of *Leishmania* DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis. *Vet. Res. Commun.* 31, 335–341.
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 137, 214–221.
- Gramiccia, M., Di Muccio, T., Fiorentino, E., Scalone, A., Bongiorno, G., Cappiello, S., Paparcone, R., Manzillo, V.F., Maroli, M., Gradoni, L., Oliva, G., 2010. Longitudinal study on the detection of canine *Leishmania* infections by conjunctival swab analysis and correlation with entomological parameters. *Vet. Parasitol.* 171, 223–228.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35, 1169–1180.
- Hernández, L., Gálvez, R., Montoya, A., Checa, R., Bello, A., Bosschaerts, T., Jansen, H., Rupérez, C., Fortin, A., Miró, G., 2014. First study on efficacy and tolerability of a new alkylphosphocholine molecule (oleylphosphocholine-OIPC) in the treatment of canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Parasitol. Res.*
- Hommel, M., Jaffe, C.L., Travi, B., Milon, G., 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89 (Suppl. 1), 55–73.
- Koutinas, A.F., Polizopoulou, Z.S., Saridomichelakis, M.N., Argyriadis, D., Fytianou, A., Plevraki, K.G., 1999. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 376–383.
- Lachaud, L., Marchegui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 210–215.
- Leandro, C., Santos-Gomes, G.M., Campino, L., Romão, P., Cortes, S., Rolão, N., Gomes-Pereira, S., Riça Capela, M.J., Abranches, P., 2001. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 273–284.
- Leite, R.S., Mendes, V.C., Ferreira, A.L., Andrade, A.S., 2011. The use of conjunctival swab samples for PCR screening for visceral leishmaniasis in vaccinated dogs. *Rev. Bras. Parasitol.* 20, 36–41.
- Lombardo, G., Pennisi, M.G., Lupo, T., Migliazzo, A., Capri, A., Solano-Gallego, L., 2012. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Vet. Parasitol.* 184, 10–17.
- Maia, C., Nunes, M., Cristóvão, J., Campino, L., 2010. Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Trop.* 116, 193–199.
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J.M., Gonçalves, L., Campino, L., 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.* 179, 142–144.
- Mancianti, F., Falcone, M.L., Giannelli, C., Poli, A., 1995. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 59, 13–21.
- Mancianti, F., Meciani, N., 1988. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counter immunoelectrophoresis. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1409–1411.
- Manna, L., Reale, S., Picillo, E., Vitale, F., Gravino, A.E., 2008. Urine sampling for real-time polymerase chain reaction based diagnosis of canine leishmaniasis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 64–67.
- Martínez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O., Altet, L., 2011. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasit. Vectors* 4, 57.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G., Baneth, G., 2008. Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 24, 371–377.
- Miró, G., Oliva, G., Cruz, I., Cañavate, C., Mortarino, M., Vischer, C., Bianciardi, P., 2009. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. *Vet. Dermatol.* 20, 397–404.
- Momo, C., Jacintho, A.P., Moreira, P.R., Munari, D.P., Machado, G.F., Vasconcelos, R.e.O., 2014. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. *Vet. Med. Int.* 2014, 150582.
- Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Parejo, J.C., Serrano, F.J., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez-Nieto, L.C., 2013. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Trop.* 128, 706–709.
- Proverbio, D., Spada, E., Bagnagatti de Giorgi, G., Perego, R., Valena, E., 2014. Relationship between *Leishmania* IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. *Biomed. Res. Int.* 2014, 412808.
- Quaresma, P.F., Murta, S.M., Ferreira, E.e.C., da Rocha-Lima, A.C., Xavier, A.A., Gontijo, C.M., 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop.* 111, 289–294.
- Reithinger, R., Lambson, B.E., Barker, D.C., Counihan, H., Espinoza, C.J., González, J.S., Davies, C.R., 2002. *Leishmania* (Viannia) spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 76–78.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sánchez-Robert, E., Francino, O., Alberola, J., 2007. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int. J. Parasitol.* 37, 683–693.
- Rosypal, A.C., Troy, G.C., Duncan, R.B., Zajac, A.M., Lindsay, D.S., 2005. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum*. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 802–809.
- Saridomichelakis, M.N., 2009. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet. Dermatol.* 20, 471–489.
- Silva, F.L., Rodrigues, A.A., Rego, I.O., Santos, R.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M., Xavier, M.N., Nascimento, E.F., 2008. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Parasitol.* 151, 86–90.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 165, 1–18.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., The LeishVet Group, 2011.

- LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 4, 86.
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Trotta, M., Zampieron, C., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M., Roura, X., Alberola, J., 2007. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 147, 315–319.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J. Infect. Dis.* 189, 1729–1733.
- WHO, Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva, 2010.

4.2. Objetivo 2: Conocer la eficacia leishmanicida y la tolerancia de la administración intravenosa de una nueva formulación de anfotericina B en estado poliagregado (FPA) en el tratamiento de la leishmaniosis canina en perros con infección experimental, evaluando la evolución clínica de los animales post-tratamiento.

Actualmente, y a expensas del desarrollo de vacunas seguras y eficaces, la quimioterapia sigue siendo fundamental en el control de la Lcan y humana. Los fármacos disponibles hoy en día para tratar la Lcan han evolucionado poco en los últimos años, y a pesar de conseguir una buena respuesta clínica al tratamiento, ninguno de ellos es capaz de eliminar completamente al parásito, y por tanto, de evitar recidivas (Miró *et al.*, 2008; Oliva *et al.*, 2010). Además, la aparición de resistencias frente a dichos fármacos (Croft *et al.*, 2006; Mohapatra, 2014) aumenta la necesidad de desarrollar nuevos principios activos o mejorar la eficacia y reducir la toxicidad de los ya existentes.

La AmB ha demostrado ser un potente leishmanicida, tanto en humanos como en perros. Sin embargo, su uso es limitado en perros por la dificultad que supone su administración, y fundamentalmente, por las numerosas reacciones adversas (Miró y Molina, 2006; Laniado-Laborín y Cabrales-Vargas, 2009). La toxicidad se ha conseguido reducir en gran parte mediante formulaciones lipídicas (Lamote, 2001) y nuevos sistemas de transporte (Sánchez-Brunete *et al.*, 2004; Daftarian *et al.*, 2013), sin embargo, su coste continúa siendo muy elevado.

Una alternativa más económica la constituye la FPA, la cual ha demostrado resultados prometedores *in vitro* e *in vivo* en ratones (Gaboriau *et al.*, 1997; van Etten *et al.*, 2000; Espada *et al.*, 2008a; 2008b; Mohamed-Ahmed *et al.*, 2013). La agregación de las moléculas de AmB confieren al

producto final un tamaño de partícula mucho mayor que el de la AmB dimérica convencional, siendo dicho tamaño de partícula inversamente proporcional a la toxicidad del producto (Espada *et al.*, 2008a).

En consecuencia, decidimos estudiar tanto la tolerancia como la eficacia clínica y parasitológica de FPA en perros con infección experimental por *L. infantum*. Asimismo, se valoró la seguridad del fármaco en dos perros sanos de la misma raza, considerado el grupo control. Los resultados obtenidos en el modelo animal canino utilizado nos han permitido conocer la ausencia de eficacia de FPA a la dosis empleada tanto leishmanicida como clínica. El tratamiento empleado con FPA no eliminó el parásito del principal órgano diana de *Leishmania*, la MO, con la consiguiente sucesión de recidivas, y la presentación de efectos adversos en los animales tratados. Por consiguiente, consideramos necesaria una reconsideración de la formulación de FPA empleada y la investigación de nuevas moléculas, más seguras y eficaces.

Publicación científica:

Hernández, L., Bolás-Fernández, F., Montoya, A., Checa, R., Dado, D., Gálvez, R., Serrano, D., Torrado, J., Otranto, D., Latrofa, M. and Miró, G. (2015). Unresponsiveness of experimental canine leishmaniosis to a new amphotericin B formulation. *Advances in Pharmaceutics*, 2015, 1-13.

Research Article

Unresponsiveness of Experimental Canine Leishmaniosis to a New Amphotericin B Formulation

Leticia Hernández,¹ Francisco Bolás-Fernández,² Ana Montoya,¹ Rocío Checa,¹ Diana Dado,¹ Rosa Gálvez,¹ Dolores R. Serrano,³ Juan J. Torrado,³ Domenico Otranto,⁴ Maria S. Latrofa,⁴ and Guadalupe Miró¹

¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

²Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Plaza Ramon y Cajal, 28040 Madrid, Spain

³Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramon y Cajal, 28040 Madrid, Spain

⁴Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Valenzano, 70010 Bari, Italy

Correspondence should be addressed to Guadalupe Miró; gmiro@ucm.es

Received 10 September 2014; Accepted 7 December 2014

Academic Editor: Maria J. Morilla

Copyright © 2015 Leticia Hernández et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This study was designed to evaluate the efficacy and safety of a novel free polyaggregated amphotericin B (FPA) formulation used to treat experimental canine leishmaniosis (CanL) caused by *Leishmania infantum*. Eight healthy beagles were intravenously challenged with 5×10^7 promastigotes per mL of *L. infantum*. One year after infection, they received an intravenous dose of FPA (5 mg/kg) every 2 weeks three times. Dogs were assessed monthly for clinical signs, serology, and parasite detection during a follow-up period of 6 months. Transient adverse effects (i.e., hypotension, diarrhea, bodyweight loss, fever, and asthenia) were observed within 24–48 hours after treatment in 4 animals. In three dogs mean clinical signs scores were reduced. Antibody titers measured by immunofluorescence antibody test (IFAT) had significantly diminished at the end of the study, although according to bone marrow smears and cultures a high percentage of dogs tested positive for the parasite at 6 months posttreatment (PT6). Real-time quantitative PCR (rtQ-PCR) on blood, bone marrow, and urine samples revealed the presence of parasitic DNA in all animals at PT6, although blood loads of the parasite were reduced. These findings indicate that FPA at the dosing regimen used did not achieve clinical or parasitological cure in dogs experimentally infected with *L. infantum*.

1. Introduction

Canine leishmaniosis (CanL) is a serious zoonotic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). The disease is endemic in many countries worldwide, including the Mediterranean basin, Portugal, South Africa, and Latin America [1], and is of major veterinary and public health concern since domestic dogs are the main reservoir of *Leishmania infantum* [2]. Infected female sand flies of the genus *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae) are the biological vectors for *L. infantum* in Europe. These hematophagous insects transmit the disease by

inoculating metacyclic promastigotes in the skin of vertebrate hosts [3].

In dogs, the incubation period of the disease may last from 3 months to several years [4]. Importantly, in areas where the disease is endemic, a large number of infected dogs do not develop clinical signs or clinicopathological abnormalities and are referred to as clinically healthy infected dogs [1]; however, they remain infective to sand flies. CanL is a systemic disease that displays a wide spectrum of clinical signs, such as generalized lymphadenomegaly, weight loss, lethargy, skin lesions, and other less common signs like polyuria/polydipsia, digestive disorders, ocular lesions, and

lameness or even neurological and cardiorespiratory abnormalities. Common hematological and biochemical findings include nonregenerative anemia, thrombocytopenia, hypergammaglobulinemia, hypoalbuminemia, a reduced albumin/globulins (A/G) ratio, and proteinuria/renal azotemia in dogs with renal disease [1, 5–7]. CanL is also associated with a high prevalence of chronic renal insufficiency caused by glomerulonephritis, which, in turn, is the main cause of mortality in dogs [8].

Despite recent advances in the diagnosis and control of CanL, the clinical management of sick animals is still a challenge for veterinarians and the antileishmania drugs used over decades are still used today. Although therapy often achieves clinical cure, it does not fully eliminate the parasite or prevent relapse [9], and dogs consequently remain infective to sand flies [10–13].

Today, the combination meglumine antimoniate and/or miltefosine plus allopurinol (a leishmanistatic agent) is considered the most effective first line treatment for CanL [9, 10, 14]. When combined with allopurinol, both drugs have proved to be more effective [10, 15]. Miltefosine is the most used in dogs with renal insufficiency [16]. Many other drugs have also been tested including amphotericin B (AmB) [17, 18], aminosidine [19, 20], pentamidine [21], metronidazole and spiramycin combined [22], enrofloxacin [23], marbofloxacin [24], ketoconazol [9], and oleyl phosphocholine [25]. More recently, domperidone has been licensed in some European countries as an immunomodulatory drug [26].

AmB is a polyene macrolide antibiotic derived from the actinomycete *Streptomyces nodosus* [27]. While traditionally used as an antimycotic, it has also shown activity against protozoal species such as *Leishmania* and *Naegleria* [28]. AmB acts by binding primarily to ergosterol in cell membranes, altering their permeability via the formation of aqueous pores permeable to small cations, particularly K^+ , with the consequence of cell death [29]. AmB is currently the most effective drug for the treatment of human visceral leishmaniosis (VL), and a liposomal AmB formulation is the first line treatment in Europe, United States, and Asia [30, 31]. However, nephrotoxicity caused by renal vasoconstriction and reduced glomerular filtration is the main side effect of AmB and can lead to renal insufficiency, hypokalemia, and elevated blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine [32, 33]. In dogs, its use thus requires close monitoring of renal function during treatment. Other common side effects reported have been nausea, vomiting, fever, tremors, and local periphlebitis [34].

With the aim of improving the efficiency of AmB deoxycholate (Fungizona) and reducing its toxicity, new formulations have been developed consisting of carrier systems such as lipid emulsions [17], liposomes [18], nanoparticles [35], and microspheres [36]. However, their high production costs, along with the use of AmB deoxycholate as the first line treatment for human VL, have limited their use in veterinary medicine.

AmB desoxycholate diluted in a lipid soya bean oil emulsion for the treatment of dogs naturally infected with CanL [17, 37, 38] has been reported in several studies to

show a high initial clinical efficacy, although anorexia, vomiting, and reversible serum creatinine elevation have been observed [17, 37]. This formulation also has the drawback of a complex manufacturing process. In another study [18], AmB encapsulated in liposomes (Ambisome) was administered to 13 dogs with natural *L. infantum* infection. However, although clinical cure was rapid, 12 dogs underwent relapse 4–6 months after treatment and all dogs remained infected.

The aggregation state of a drug and particle size play a role in its toxicity, tissue distribution, and efficacy [39]. During aggregation in liquid medium, AmB molecules self-aggregate to form polyaggregates conferring the final product with a particle size far greater than that of the dimers in conventional AmB. Polyaggregated AmB is much less toxic to mammalian cells [40, 41], as observed both *in vitro* and *in vivo* (in a murine model) [42–44].

The present study was designed to assess the efficacy and safety of a new cost-effective formulation of AmB, free polyaggregated AmB (FPA), administered intravenously (IV) as three doses (5 mg/kg) separated by two-week intervals to treat experimentally induced CanL.

2. Material and Methods

2.1. Animals. Eight healthy female intact Beagle dogs (8 months old, body weight 10.5 to 16.6 kg) were housed in indoor kennels. Each dog was dewormed and vaccinated against rabies, canine distemper, hepatitis/adenovirus type 2, leptospirosis, and parvovirus. All dogs were microchipped and assigned a study number [1–8]. The kennel windows were sprayed with deltamethrin at 25 mg/m² and fitted with double antimosquito nets to avoid natural *Leishmania* infection. The dogs were kept in quarantine for 30 days and had daily access to food pellets and water *ad libitum*. The study protocol was designed according to international guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and Spanish Legislation guidelines (RD 1201/2005) and was approved by the Ethics Committee of the Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain).

The tolerance and pharmacokinetics of the drug formulation under test were assessed in other two female healthy intact Beagle dogs (4 years old, bodyweight 13.1 and 17 kg). These animals were separately kept in the same conditions as described above. Before experimental infection and drug administration, it was checked that these animals were negative for *L. infantum* infection by PCR on blood and bone marrow aspirates and an indirect immunofluorescence antibody test (IFAT, see below). Their good clinical condition was also confirmed in a complete hematological and biochemical evaluation.

2.2. Parasites and Experimental Infection. Details of the experimental infection have been described previously [45]. Briefly, dogs were intravenously infected with 5×10^7 promastigotes of *L. infantum* (zymodeme MON-1, strain MCRI/ES/06/BCN-721) per mL in a total volume of 0.5 mL and were followed for 12 months.

During one year of follow-up, clinical, immunological, and parasitological examinations were performed monthly. Seroconversion in all animals was produced at 120–180 days postinfection (p.i.). This was confirmed through positive bone marrow cytology and cultures in Novi-McNeal-Nicolle (NNN) media and through the detection of parasite DNA in blood and bone marrow by real-time quantitative PCR (rtQ-PCR). Clinical signs and/or clinicopathological abnormalities compatible with CanL appeared within 120 days after infection. Accordingly, at 180 days p.i., all animals showed clinical signs of CanL.

On Day 360 p.i., the disease in all animals except Dogs 1 and 3 was classified as clinical leishmaniosis stage II according to the system of the Leishvet group [5]. Based on the presence of proteinuria, infection in the latter animals was classified as substage IIb [5].

2.3. Study Design and Sample Collection

2.3.1. Infected Dogs. Treatment with FPA was started on Day 390 p.i. Treatment follow-up examinations ($n = 9$) were performed just before the dogs received each of three doses of FPA every two weeks (treatment Days T1, T2, and T3) and monthly thereafter for 6 months (posttreatment Days PT1, PT2, PT3, PT4, PT5, and PT6). Follow-up sessions consisted of a physical exam and clinicopathological, serological, and parasitological tests. Samples were also collected (blood, bone marrow, and urine) to assess the efficacy and safety of treatment (see below).

Peripheral blood samples (5 mL), obtained by cephalic venipuncture, were distributed into four tubes containing (a) lithium heparin, for biochemical tests, (b) ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) for complete blood counts (CBC), (c) EDTA for rtQ-PCR *Leishmania* detection, and (d) no additives to determine electrolytes (K^+ , Na^+ , and Cl^-) and for antibody testing (IFAT). The blood variables determined were red blood cell count (RBCC), packed cell volume (PCV), white blood cell count (WBCC), and platelet count. The blood biochemical variables measured to assess renal and hepatic function were urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total plasma protein, A/G ratio, and serum proteins by electrophoresis.

Urine was collected by catheterization for complete urinalysis including urinary protein creatinine ratio (UPC). An aliquot of urine was used for DNA extraction and quantification.

Bone marrow aspirates (0.5 mL) were obtained from the fifth-sixth costochondral junction for cytological examination and culture onto NNN medium. An aliquot was stored in buffer NET 10 (NaCl 10 mM, EDTA 10 mM, and Tris 10 mM) at -20°C for DNA extraction.

2.3.2. Healthy Dogs. Blood and urine samples collected from the two female healthy beagles before and after the administration of a single dose of FPA served as controls and were used for the pharmacokinetics study.

2.4. Treatment

2.4.1. Formulation. FPA was prepared at the Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy (Universidad Complutense de Madrid), according to the procedure described by Espada et al. [46]. Briefly, 50 mg of AmB (supplied by Azelis, Spain) was dispersed in 5 mL of an aqueous solution containing 41 mg of sodium deoxycholate (Fluka Chemie A.G., Buchs, Switzerland), 10 mg of dibasic sodium phosphate, and 0.9 mg of monobasic sodium phosphate (Panreac S.A., Barcelona, Spain). Once the drug was homogeneously dispersed, deionised water was added to the resulting mixture up to a final volume of 10 mL, obtaining a final concentration of 5 mg/mL.

2.4.2. Drug Administration. The three 5 mg/kg doses of FPA given at two-week intervals were administered intravenously by slow perfusion for 10 minutes in an approximate total volume of 40–60 mL, depending on bodyweight, by the investigator until completing a cumulative dose of 12 mg. Before receiving FPA, dogs were pretreated with physiological saline solution containing 0.9% NaCl (Braun Medical S.A., Madrid, Spain) at a dose of 50 mL/kg IV for 15–20 min to prevent hypokalemia. Prior to administration, FPA (5 mg/mL) was diluted 1:1:2 in 5% glucose (Braun Medical S.A., Madrid, Spain) and 0.9% NaCl, respectively, to give a final concentration 1.25 mg/mL of AmB.

In each dog, consecutive doses were administered via alternating cephalic veins.

The two healthy Beagles used as controls only received a single dose of FPA according to the same procedure.

2.5. Assessment of Treatment Efficacy

2.5.1. Clinical Efficacy

(a) Physical Examination. At each time point during the treatment period (T1–T3) and 6-month posttreatment period (PT1–PT6), animals were subjected to a complete physical examination. In this exam, body temperature was recorded and animals were weighed and scored for 23 clinical signs using a categorized scoring system from 0 to 3 (from low to high severity), as described in Table 1 (adapted from Miró et al., [15]). By adding the points awarded to each variable, an overall monthly clinical score was calculated (maximum possible score = 52). The clinical response to treatment was assessed by examining changes in clinical score over time as score percentage reductions (PR) calculated using the following equation:

$$PR_i = 100 \times \frac{[(\text{score at T1}) - (\text{score at PT}_i)]}{(\text{score at T1})}, \quad (1)$$

i is the corresponding day posttreatment.

(b) Clinicopathological Analysis. Each animal was scored for 12 clinicopathological variables (CBC, biochemical profile, electrolytes, urinalysis, and UPC) using a categorized scoring

TABLE 1: 24 parameters clinical scoring scale of dogs infected with *L. infantum*.

Condition and affected organ	Clinical sign	Severity grade			
		0	1	2	3
General	Appetite	Normal	Decreased	Anorexia	—
	Asthenia	Absence	Mild	Prostration	—
	Fatigue	Absence	Mild	Severe	—
	Polyuria/Polydipsia	Absence	—	—	Presence
Muscles	Temporal muscles amyotrophy	Absence	Slight temporal amyotrophy	Marked temporal amyotrophy	—
	General amyotrophy	Absence	Slight amyotrophy (emaciation)	Cachexia	—
Immune system	Adenopathy	Absence	Localized	—	Generalized
	Splenomegaly	Absence	—	—	Presence
Eyes	Conjunctivitis, blepharitis, and keratitis	Absence	Mild	Severe	—
	Uveitis	Absence	—	—	Presence
Mucosae	Pale mucosae	Absence	—	Presence	—
	Epistaxis	Absence	—	—	Presence
	Oral lesions	Absence	1 or 2 ulcers and/or nodules	More than 2 ulcers and/or nodules	—
Digestive system	Vomiting	Absence	Occasional	Frequent	—
	Diarrhea	Absence	Occasional	Frequent or melena	—
Joints	Lameness and joint pain	Absence	—	—	Presence
Skin	Erythema	Absence	—	Presence	—
	Ulcers	Absence	1 ulcer or 2 ulcers	>3 ulcers	—
	Alopecia	Absence	Localized or mild	Alopecia on more than 25% of the body surface	—
	Exfoliative dermatitis	Absence	Localized	Generalized	—
	Hyperkeratosis of nose	Absence	—	Presence	—
	Hyperkeratosis of footpads	Absence	—	Presence	—
	Generalized hyperkeratosis	Absence	—	Presence	—
	Onychogryphosis	Absence	—	Presence	—

system from 0 to 2 (maximum possible score of 19) (Table 2). Percentage reductions in scores over time were also calculated.

2.5.2. Serological Follow-Up. Anti-*L. infantum* immunoglobulin G (IgG) antibodies were detected by IFAT (cut-off 1/100) as described previously [47] on serum dilutions ranging from 1/50 to 1/12800.

2.5.3. Parasitological Follow-Up

(1) **Microscopy, Molecular Procedures, and Specific Bone Marrow Culture in NNN.** The leishmanicidal efficacy of FPA was assessed by microscopy examination of *Leishmania* amastigotes in three Giemsa-stained bone marrow aspirate smears and promastigotes in bone marrow cultures grown in NNN medium. Blood, bone marrow aspirates, and urine samples collected before and after treatment were subjected to rtQ-PCR (as described below) at each time point. Stained bone marrow sections were always interpreted by the same operator. Bone marrow aspirates in biphasic NNN cultures [48]

were incubated at 27°C, passaged, and examined weekly under the light microscope over a 4-week period; samples reversing four consecutive negative results were scored as negative [49].

(2) **DNA Extraction.** DNA from peripheral whole blood samples (100 µL), bone marrow aspirates (100 µL), and urine (800 µL) was extracted using the QuiAmp DNA Micro Kit [50] (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. The extracted DNA was eluted in sterilized water (70 µL) and stored at −20°C until use.

(3) **Real-Time Quantitative PCR.** Over the course of post-treatment follow-up (PT1, PT6), DNA samples were subjected to rtQ-PCR for the simultaneous detection and quantification of *L. infantum* kinetoplast minicircle DNA (kDNA, 120 pb) using the primers *LEISH-1* (5'-AACTTT-TCTGGTCTCTCCGGGTAG-3') and *LEISH-2* (5'-ACCCCC-AGTTTCCCGCC-3') and TaqMan-MGB probe (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-nonfluorescent quencher-MGB) designed by Francino et al. [50]. In a final volume of 20 µL, the reaction mixture contained 10 µL of iQ Supermix

TABLE 2: Clinicopathological scores recorded in dogs infected with *L. infantum*.

Parameter	Severity grade		
	0	1	2
CBC			
Hematocrit/hemoglobin	Normal	Mild anemia	Severe anemia
Leukocytes	Normal	Leukocytosis	Leukopenia
Platelets	Normal	—	Thrombocytopenia
Biochemical profile			
Proteins	Normal	Proteinemia	—
Urea	Normal	Elevated	—
Creatinine	Normal	Elevated	—
Albumin/globulin ratio	Normal	Reduced	—
ALT	Normal	Elevated	—
Electrolytes			
K ⁺ , Na ⁺ , and Cl ⁻	Normal	—	Increased
Urine			
Urine specific gravity	Normal	Reduced	—
Proteins	Normal	100 mg/dL	≥500 mg/dL
Protein/creatinine ratio	Normal (<0.5)	>0.5 <2	>2

(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), each primer at a concentration of 900 nM, the probe at a concentration of 200 nM, and 2 μ L of template DNA. The thermal cycling profile consisted of a hot start at 95°C for 3 min and 42 cycles of denaturation (95°C for 10 s) and annealing-extension (60°C for 30 s). All assays were carried out in duplicate, with negative and positive controls included in each run. rtQ-PCR was performed in a CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA). The fluorescent signal increase was recorded during the extension step of the reaction and the data were analysed using CFX Manager Software Version 1.6 (Bio-Rad).

The amount of *Leishmania* kDNA in the different samples was determined by the absolute quantification method. A 10-fold dilution series of standard DNA from promastigotes (log phase concentration, 1.7×10^6 parasites/mL) of *L. infantum* (zymodeme MON-1) was used to construct a standard curve, and then each dilution was tested in triplicate [51]. The limit of detection of the rtQ-PCR procedure was assessed using a serial dilution from 1.7×10^{-1} to 1.7×10^{-8} parasites per reaction. Results are expressed as absolute numbers of parasites present in 1 mL of blood, bone marrow, or urine.

2.6. Safety Assessment. During the course of the study, all adverse events were recorded as the nature of the side effect, time of occurrence, duration, severity, and, if needed, the medical intervention required.

2.7. Statistical Analysis. All data were analyzed using SAS system version 9.2 software. Descriptive statistics were calculated for each set of data (i.e., for each analyte or parameter), including the mean, median, I–III interquartile ranges, standard deviation (SD), minimum and maximum values for quantitative variables, frequencies and percentages for

each score class, and other qualitative variables. Since the factors tested before and after treatment were not normally distributed, the nonparametric Wilcoxon signed rank test was used for comparisons between two time points and to explain efficacy criteria. Pretreatment or posttreatment variables were correlated with each other, and degree and significance of correlations were determined through Spearman's rank correlation analysis (ρ). Significance was set at $\alpha = 0.05$ (5%).

3. Results

3.1. Baseline Characteristics. The baseline characteristics of the 8 sick animals before treatment are provided in Table 3. At the time point T1, the common clinical signs of CanL observed were generalized lymphadenomegaly ($n = 8$), splenomegaly ($n = 7$), asthenia ($n = 3$), muscular atrophy ($n = 3$), conjunctivitis ($n = 6$), and skin lesions such as erythema ($n = 5$), alopecia ($n = 6$), exfoliative dermatitis ($n = 7$), generalized dermatitis ($n = 3$), hyperkeratosis of the nose ($n = 6$) and of the footpads ($n = 8$), and onychogryphosis ($n = 5$). The mean (\pm SD) clinical score at T1 was 16.5 ± 7.6 out of a maximum of 52. Dogs 2, 3, and 7 showed more severe skin lesions increasing their individual scores (to 28, 21, and 25, resp.). Most prominent abnormalities were observed at T1 including anemia (defined as reduced RBCC, hemoglobinemia, and hematocrit) ($n = 7$) and thrombocytopenia ($n = 4$).

At T1, all the dogs featured hyperproteinemia (range: 8.5–12 g/dL) and a reduced A/G ratio (range: 0.19–0.55), due to hypoalbuminemia and hypergammaglobulinemia. Other biochemical variables indicating kidney (urea and creatinine) and liver (ALT and ALP) function were normal in most of the dogs. Mild proteinuria was only detected in Dogs 1 and 3 (UPC = 0.97 and 0.66, resp.). At this time point, IFAT antibody titers were 1/600 to 1/6400.

TABLE 3: Clinical, clinicopathological, serological, and parasitological follow-up of eight dogs experimentally infected with *L. infantum* before (T1) and after treatment (PT6) with free polyaggregated amphotericin B.

Dog	Clinical score		Clinicopathological score		Weight		IFAT		BM cytology		BM culture		BM rtQ-PCR		Blood rtQ-PCR		Urine rtQ-PCR	
	T1	PT6	T1	PT6	T1	PT6	T1	PT6	T1	PT6	T1	PT6	T1	PT6	T1	PT6	T1	PT6
1	16	22	5	5	11.2	12.3	1/6400	1/1600	+	+	+	+	24420	7140000	24535	22.5	2.02	0
2	28	17	3	6	10.1	12.3	1/6400	800	+	+	+	+	3630	106800	945	8.44	0.22	0.53
3	21	27	4	5	10	6.7	1/6400	1600	+	+	+	+	22170	639	381.5	23.4	0.31	0.14
4	16	15	6	10	16.4	19.7	1/3200	1600	+	+	+	+	44700	1272000	70000	8.73	0	0
5	5	12	2	5	18.5	11	1/1600	3200	+	+	+	+	2577	42900	0	2.4	0.23	0.11
6	9	10	7	10	15.2	15.5	1/1600	1600	+	-	+	+	9060	22680	756	2.28	0.34	0
7	25	8	6	6	11.3	12.45	1/6400	1600	+	+	+	+	26610	53700	1711.5	0.393	8.57	0.43
8	12	4	6	7	16.2	17.15	1/3200	1/100	+	-	-	-	0.3796	0.088	0	0	0	0

Prior to FPA administration, clinical and laboratory findings in the two healthy Beagles confirmed their good clinical condition.

3.2. Treatment Efficacy

3.2.1. Clinical Efficacy. The clinical response to treatment varied in each animal as shown in Table 3. After the first FPA dose, clinical scores in 7 animals increased owing to asthenia, polydipsia, and weight loss. After completing the full course of FPA treatment, the greatest clinical improvement was recorded in Dog 8, lymphadenomegaly and splenomegaly being the only clinical signs at PT6. Dogs 1, 3, and 5 showed no clinical response to treatment and skin lesions, such as alopecia, dermatitis, and generalized hyperkeratosis, even worsened, as did muscular atrophy and lymphadenomegaly.

Over the time period T1 to PT6, the mean percentage reduction in clinical score was $3.55 \pm 60.91\%$, Dogs 7 and 8 showing the greatest percentage score reductions (65.22 and 61.54%, resp.). In contrast, Dog 5 displayed a clearly worsening clinical picture reflected by a negative percentage score reduction. No significant changes in scores were observed throughout the posttreatment period when compared with scores obtained on Day T1.

Over the 6-month course of follow-up, bodyweights increased though not significantly with the exception of Dogs 3 and 5 that gradually lost weight. Clinical score and bodyweight were negatively correlated at PT1 ($P = 0.016$ and $\rho = -0.8$) such that animals losing weight showed higher clinical scores.

3.2.2. Clinicopathological Abnormalities. Of the seven animals with anemia on Day T1, three had a hematocrit $< 30\%$. After treatment follow-up, seven dogs remained anemic, and in five of these (Dogs 1, 4, 5, 6 and 7) the hematocrit was $< 30\%$ (mean = $29.03\% \pm 5.19$), the reduction between PT3 and PT6 being significant ($P = 0.0047$).

Leukocyte levels remained stable during the study and only Dogs 4, 5, and 6 showed mild leukopenia on day PT6 (the lowest leukocyte count $2800 \times 10^3/\mu\text{L}$ in Dog 4). At the end of the study, five animals showed thrombocytopenia (the lowest platelet count $26 \times 10^3/\mu\text{L}$ in Dog 4), and only in Dog 8 did this variable return to normal after treatment.

Mean serum concentrations of urea, creatinine, ALT, and ALP did not significantly change during the study, nor were any significant differences recorded in ion levels (K^+ , Na^+ , and Cl^-). At PT6, the number of dogs still with hyperproteinemia after the monitoring period was only slightly reduced, and only in Dogs 3 and 5 were physiological levels of serum proteins recovered. At the end of the study, all treated dogs still showed severe dysproteinemia: an A/G ratio < 0.3 was recorded in seven animals. In Dog 8, this ratio increased to 0.61.

Despite no significant differences detected in the UPC during the study, in response to treatment, five animals (1, 4, 5, 6, and 7) changed from a nonproteinuric stage to a proteinuric or borderline proteinuric stage, with results ranging from 0.51 (Dog 5 at PT6) to 3.17 (Dog 1 at PT3). In parallel, some dogs

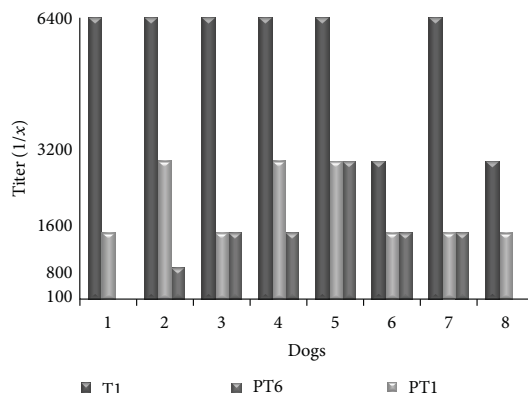


FIGURE 1: Immunofluorescence antibody test (IFAT) titers of anti-*Leishmania* antibodies in eight dogs with experimental leishmaniosis before (T1) and after (PT1 and PT6) treatment with free polyaggregated amphotericin B.

(3, 5, 6, and 8) experienced a slight reduction in urine specific gravity.

No clinicopathological alterations were detected after one day and one week of treatment administration in the two healthy control dogs.

3.2.3. Serological Follow-Up. IFAT anti-*L. infantum* antibody titers for the 8 animals determined at the nine time points are provided in Figure 1. In all cases, titers were significantly lower at PT6 compared to T1. Six animals showed a steady decrease in antibody levels: in three of these a twofold reduction was observed at PT6, and in Dog 8 a fivefold decrease was detected reaching the cut-off of 1/100. By the end of the study, negative correlation was observed between antibody titer and bodyweight ($P = 0.006$ and $\rho = -0.898$). However, no significant correlation was found between IFAT titer and clinical score.

3.2.4. Parasitological Follow-Up

(1) Microscopy and Specific Bone Marrow Culture in NNN. By the end of the study, only Dog 8 scored negative for both bone marrow aspirate cytology and culture (Table 3). Although *Leishmania* amastigotes were not detected in some animals at some points during the posttreatment period, five out of seven dogs tested at 6 months posttreatment (PT6) returned positive bone marrow aspirate smears and cultures. Positive cytology results correlated positively with culture results both before and after treatment administration ($P < 0.0001$ and $\rho = 1$).

(2) Molecular Procedures. After the six-month follow-up period, all animals remained *Leishmania*-positive according to some of the samples analyzed by rtQ-PCR. High variation in parasite loads was observed among individuals, both before and after treatment with FPA. This study revealed bone marrow was the tissue varying the most in terms of parasite

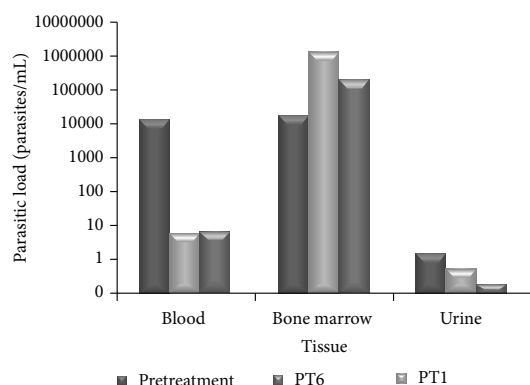


FIGURE 2: Mean parasite loads (parasites/mL) determined by real-time quantitative PCR in blood, bone marrow, and urine samples before treatment (one year p.i.), and one month (PT1) and six months (PT6) after treatment.

numbers among the eight dogs and loads ranged from 8.8×10^{-2} (Dog 8) to 1.272×10^6 parasites/mL (Dog 4) at the end of treatment (PT6). Figure 2 shows the changes produced in mean parasite loads in the different samples tested before and six months after treatment. The bar chart shows a significant drop ($P = 0.03$) in the parasite burden of the blood at the expense of a marked increase in the bone marrow load.

The lowest intensity of infection and the lowest IFAT titers in all samples were recorded in Dog 8. This animal also showed the best clinical response to treatment and was PCR-negative in urine and blood during the entire study period. The remaining animals showed significantly reduced ($P = 0.03$) blood circulating parasite levels except for Dog 5, which returned a positive PCR result on day PT6 of 2.6 parasites/mL of blood.

Contrary to the trend observed in blood, at PT6, bone marrow burdens were still elevated. Despite the presence of rtQ-PCR amplified *Leishmania* kDNA in the urine of six animals (Dogs 1, 2, 3, 5, 6, and 7) at one year p.i., parasite loads in urine were significantly lower than in the other sample types. Urine parasite loads in Dog 7 before treatment ranged from 1.95 ± 3.16 parasites/mL to a maximum of 8.57 parasites/mL. On day PT6 the mean parasite burden fell to 0.3 ± 0.19 parasites/mL; animals 4 and 8 remained PCR-negative and Dog 6 became negative.

3.3. Safety Assessment. At the time of the first dose of FPA given to the experimentally infected Beagles, several events (hypotension, diarrhea, abdominal pain, appetite and bodyweight loss, fever, and asthenia) more likely related to AmB administration were reported. Hypotension occurred from 15 min to 1 h after administration. Dogs 2, 4, 7, and 8 experienced these side effects more frequently after the first dose of FPA. No specific treatment for these episodes was needed and the follow-up of these animals progressed in conformity with the study protocol. Dog 8 did not tolerate the second treatment dose (T2), showing profuse diarrhea,

weakness, severe hypotension, and fever (40.1°C). This animal required complementary treatment with ranitidine (Zantac: 1 mg/kg/12 hours) and a special diet for gastrointestinal problems (i/d Hills). Because of this reaction, this animal was not given a third dose.

After treatment, the clinical condition of Dog 1 worsened in terms of increased anemia, thrombocytopenia, proteinuria ($\text{UPC} > 2$), and A/G inversion, and at PT5 the animal was prostrated, weak, asthenic, and jaundiced. Blood tests revealed severe nonregenerative anemia, thrombocytopenia, neutrophilia, hypoalbuminemia, and hypergammaglobulinemia. For ethical reasons, this dog was euthanized after PT5. At necropsy, splenomegaly, hepatomegaly, bronchopneumonia, and pericarditis were observed. Histological findings identified the existence of visceral leishmaniosis (with hepatic and splenic lesions, including vacuolar degeneration of hepatocytes, Kupffer cell hyperplasia with the intracytoplasmic presence of *Leishmania* amastigotes, hemosiderin accumulation in the splenic capsule, diffuse macrophage hyperplasia with *Leishmania* amastigote infection, and extramedullary splenic hematopoiesis), and severe fibrinous bronchopneumonia associated with Gram-negative infection. Immunohistochemistry indicated the presence of *Leishmania* spp. with strong labeling observed in the spleen. The death of this animal was attributed to a nonregenerative anemia, hepatitis, pericarditis, and a serious Gram-negative bacterial lung infection associated with visceral leishmaniosis and pneumonia.

No adverse events were observed in healthy dogs used as controls after the administration of a single FPA dose.

4. Discussion

The present clinical trial was designed to evaluate the efficacy and safety of a novel AmB formulation (FPA) for the treatment of experimental CanL.

FPA therapy failed to improve clinical status in the majority of infected dogs. What is more, 50% of animals showed worsening of clinical signs, especially skin lesions, by the end of the 6-month treatment period. Neither was parasitological cure produced in any of the dogs.

Despite a 100% success rate for active infection achieved in the eight Beagle dogs, the clinical course of infection and incubation stage varied considerably among the animals. This model reflects the wide clinical response to natural infection [52] described for canine models [53–56]. For this reason, we opted for starting treatment one year after the initial challenge when persistent clinical signs could be detected in every animal.

The increase in clinical scores observed after the first FPA dose administration could be attributed to the fact that a higher dose is needed to reach an effective concentration or due to the side effects recorded in some animals after the first treatment. In response to treatment, clinical improvement was only observed in Dogs 2 and 8 although Dog 8 only received two doses of therapy because of a severe toxic reaction after the second dose. These results differ from those obtained by other authors who used a lipid AmB emulsion

for the treatment of CanL. With this emulsion of AmB several months after treatment all animals were clinically cured [17, 37, 38], though two deaths were produced (out of 19) in the study by Lamothe [17]. Comparisons between studies are, however, hindered by the different dosing regimens and the fact that dogs were naturally infected with *L. infantum*. In addition, the qualitative scoring system used by others is not as accurate as the present system, which includes clinicopathological abnormalities and not only clinical signs.

The main drawbacks of using AmB to treat CanL are its intravenous administration route, its high cost, and its numerous side effects, particularly nephrotoxicity, since it aggravates the direct harmful effect of CanL on renal function [57]. The clinical efficacy and safety of FPA have been demonstrated in murine models [39, 46, 58] and in dogs [59]. In a study [39] in which once-weekly doses of 5 mg/kg FPA were given to mice over a 6-week period, compared with the conventional AmB formulation, high concentrations of AmB were detected in the liver and spleen, whereas levels in plasma and kidneys were lower. These results suggest that the organs of the mononuclear phagocyte system constitute a major pathway for the accumulation of FPA [39, 43], making infected macrophages more accessible to AmB. In addition, polyaggregates act as an AmB release system from larger aggregates [59]. The results observed in this murine model prompt further investigation of this formulation in the canine model.

The administration of 5 mg/kg fortnightly, three times, would offset the fast clearance from the circulation by the mononuclear phagocyte system that occurs with only one dose of FPA, achieving higher effective concentration values.

In trials assessing the treatment of dogs with lipid emulsions of AmB, anorexia, vomiting, and fever were recorded as the most common side effects in 78–81% of animals, but these gradually resolved [17, 37, 60]. In our study, apart from fever and anorexia, most of the animals suffered (in decreasing order) from hypotension, diarrhea, bodyweight loss, asthenia, and abdominal pain. However, all were self-limiting and also described for AmB treatment in dogs. A single dose of FPA caused no adverse events in healthy Beagle dogs. Regarding the renal toxicity of AmB, some authors describe a transient increase in urea and/or creatinine levels [17, 18, 37, 60]. This was not observed here and levels remained within the normal range. However, five animals became proteinuric (with elevated UPC) after treatment. Proteinuria in these dogs may have been caused by glomerulopathy due to the pathogenic effect of CanL itself, enhancing the nephrotoxic effect of AmB, mainly due to renal vasoconstriction and a reduced glomerular filtration rate [33, 37]. Nevertheless, levels of FPA have been demonstrated to be lower in plasma and kidneys, in comparison with other formulations of AmB [39]. This highlights the need to monitor renal function before and during treatment with AmB, since persistent proteinuria is usually associated with a greater frequency of renal morbidity and mortality [61]. Hence, only CanL patients with minimal or no kidney involvement should receive intravenous FPA treatment.

Dysproteinemia due to hypoalbuminemia and hypergammaglobulinemia is a common finding in CanL [57] and

was in fact observed in 100% of the present dogs at T1. FPA treatment failed to normalize these variables and this has also been observed in clinical trials on allopurinol, allopurinol-meglumine antimoniate [62], or aminosidine [63]. In contrast, miltefosine [15, 64] and oleyl phosphocoline [25] were able to rescue these abnormalities.

The humoral response recorded here increased during p.i. follow-up, and antibody titers of 1/6400 were recorded in some animals. This value exceeds that observed in other canine models, though in most of these trials 1/640 was the established limit [53, 65, 66]. Dogs showing higher clinical scores also featured higher antibody levels of the parasite, as confirmed in natural CanL [67–69]. In response to treatment, IFAT-determined titers diminished in six out of eight animals, although a clear correlation with the clinical response was not detected. Some authors have reported clinical improvement in response to treatment with miltefosine, oleyl phosphocoline, or marbofloxacin in the absence of reduced antibody titers determined by IFAT [16, 25, 70]. In contrast, both clinical and serological improvements have been observed for the use of aminosidine [63], enrofloxacin [23], allopurinol [71], miltefosine-allopurinol [15], meglumine antimoniate [72], or meglumine antimoniate-allopurinol [73]. However, most authors consider serology unrepresentative of the clinical progression of treated dogs, at least over a short period [22, 74, 75], since in a minority of animals antibody titers remain high long after clinical signs have subsided [13, 76]. Only in Dog 8 did we observe significant correlation between the reduction in antibody levels from 1/3200 to the 1/100 cut-off and a 61.54% reduction in the clinical score at PT6. This general improvement could be attributed to treatment efficacy but could also reflect a good immune Th2 response and a low intensity of *Leishmania* infection in this animal, since no DNA was found in blood and urine throughout the study, and bone marrow showed a low parasite burden (less than one parasite/mL at T1, PT1 and PT6). Moreover, as mentioned earlier, this dog did not receive the complete course of treatment and was excluded.

Throughout the year of experimental infection follow-up, a larger number of positive culture results were observed than positive smears, indicating the higher sensitivity of this technique [77]. Overall, the presence of *Leishmania* was detected in the bone marrow of all animals before treatment. The sensitivity of microscopy examination of bone marrow smears is higher (60–75%) than that of lymph nodes (30–50%) [77, 78], which are enlarged in experimentally infected dogs [79]. rtQ-PCR has a high sensitivity and specificity for the absolute quantification of *Leishmania* and serves to quantify very low levels of parasites in infected tissues even before seroconversion. This makes this technique useful for diagnosis and treatment monitoring [10, 50, 76]. In our study, the sensitivity of this technique was of 0.001 parasites per PCR reaction. Moreover, its 7-log linear dynamic range allows discrimination from 1 parasite/mL to more than 10^7 parasites/mL of sample [50]. Parasite burdens largely varied according to the animal and tissue (Table 3), bone marrow samples showing the greatest numbers of parasites/mL, followed by blood, and urine. Indeed, it has been reported that bone marrow contains a larger number of copies of

Leishmania DNA than peripheral blood [50, 76, 80]. This could be explained by the fact that bone marrow is where invasion and multiplication of the parasite takes place, acting as a target organ, while blood acts as a medium for parasite transport and not as a reservoir organ [80, 81]. Our rtQ-PCR revealed that FPA did not reduce the parasite load in bone marrow samples and, even one month after treatment, the mean burden in this tissue was still elevated in almost all animals. This could be attributable to a low capacity of FPA to reach the bone marrow or to the high parasite burden in this tissue at the onset of treatment. It should be stressed, however, that the drastic reduction in parasitemia detected at PT1 has significant implications in the fact that animals could be less infective to sand flies at the end of treatment.

Other authors have described the presence of *Leishmania* kDNA in the urine of dogs contracting natural infection [82–84]. In our study, rtQ-PCR detected no significant parasite numbers in urine, suggesting this type of sample is not reliable to quantify *Leishmania* parasite burden or monitor treatment efficacy. No positive correlation was detected between renal failure and the number of parasites in urine by rtQ-PCR [82, 83] probably because we found far fewer parasites in urine than in previous studies [83], the low number of dogs examined, and the fact that none suffered renal azotemia or severe proteinuria.

Although the small number of animals included in this study limits several conclusions, its results indicate that FPA, at the dosing regimen used, was unable to improve the clinical state or reduce hematological and biochemical abnormalities in dogs experimentally infected with *L. infantum*. A leishmanicidal effect of FPA was produced in blood, but the agent could not lower the parasite load in bone marrow, which could lead to future relapses. The present study shows the null response to AmB of dogs experimentally infected with *L. infantum*. Based on these findings, this drug should not be considered for elective treatment of canine leishmaniasis due to its numerous side effects and lack of a clear leishmanicidal effect.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) through Grant no. AGL2007-64120/GAN. The authors are grateful to Dr. Montserrat Gállego (Laboratory de Parasitologia, Universitat Autònoma de Barcelona) for providing the strain of *L. infantum* used in the experimental infection. The authors thank Jesús Modesto Moya Ortega for his assistance in the maintenance and welfare of the animals.

References

- [1] G. Baneth, A. F. Koutinas, L. Solano-Gallego, P. Bourdeau, and L. Ferrer, "Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one," *Trends in Parasitology*, vol. 24, no. 7, pp. 324–330, 2008.
- [2] M. Gramiccia and L. Gradoni, "The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control," *International Journal for Parasitology*, vol. 35, no. 11–12, pp. 1169–1180, 2005.
- [3] R. Killick-Kendrick, "Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review," *Medical and Veterinary Entomology*, vol. 4, no. 1, pp. 1–24, 1990.
- [4] R. J. Slappendel, "Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands," *Veterinary Quarterly*, vol. 10, no. 1, pp. 1–16, 1988.
- [5] L. Solano-Gallego, G. Miró, A. Koutinas et al., "LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis," *Parasites and Vectors*, vol. 4, article 86, 2011.
- [6] A. F. Koutinas, Z. S. Polizopoulou, M. N. Saridomichelakis, D. Argyriadis, A. Fytianou, and K. G. Plevraki, "Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996)," *Journal of the American Animal Hospital Association*, vol. 35, no. 5, pp. 376–383, 1999.
- [7] M. N. Saridomichelakis, "Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications," *Veterinary Dermatology*, vol. 20, no. 5–6, pp. 471–489, 2009.
- [8] F. A. L. Costa, H. Goto, L. C. B. Saldanha et al., "Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis," *Veterinary Pathology*, vol. 40, no. 6, pp. 677–684, 2003.
- [9] C. Noli and S. T. Auxilia, "Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: a systematic review," *Veterinary Dermatology*, vol. 16, no. 4, pp. 213–232, 2005.
- [10] L. Manna, S. Reale, F. Vitale, E. Picillo, L. M. Pavone, and A. E. Gravino, "Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol," *Veterinary Journal*, vol. 177, no. 2, pp. 279–282, 2008.
- [11] F. A. Ikeda-Garcia, R. S. Lopes, F. J. Marques et al., "Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate," *Veterinary Parasitology*, vol. 143, no. 3–4, pp. 254–259, 2007.
- [12] R. R. Ribeiro, E. P. Moura, V. M. Pimentel et al., "Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 52, no. 7, pp. 2564–2572, 2008.
- [13] G. Miró, R. Gálvez, C. Fraile, M. A. Descalzo, and R. Molina, "Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments," *Parasites and Vectors*, vol. 4, article 52, 2011.
- [14] P. Denerolle and G. Bourdoiseau, "Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases)," *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 13, no. 5, pp. 413–415, 1999.
- [15] G. Miró, G. Oliva, I. Cruz et al., "Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis," *Veterinary Dermatology*, vol. 20, no. 5–6, pp. 397–404, 2009.
- [16] M. Mateo, L. Maynard, C. Vischer, P. Bianciardi, and G. Miró, "Comparative study on the short term efficacy and adverse

- effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis," *Parasitology Research*, vol. 105, no. 1, pp. 155–162, 2009.
- [17] J. Lamothe, "Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis," *Journal of Small Animal Practice*, vol. 42, no. 4, pp. 170–175, 2001.
 - [18] G. Oliva, L. Gradoni, P. Ciaramella et al., "Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 36, no. 6, pp. 1013–1019, 1995.
 - [19] G. Oliva, L. Gradoni, L. Cortese et al., "Comparative efficacy of meglumine antimoniate and aminosidine sulphate, alone or in combination, in canine leishmaniasis," *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 92, no. 2, pp. 165–171, 1998.
 - [20] J. A. Vexenat, P. L. Oliaro, J. A. F. de Castro et al., "Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidine (paromomycin)," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 58, no. 4, pp. 448–453, 1998.
 - [21] A. Rhalem, H. Sahibi, N. Guessous-Idrissi et al., "Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*," *Veterinary Parasitology*, vol. 81, no. 3, pp. 173–184, 1999.
 - [22] M. G. Pennisi, M. de Majo, M. Masucci, D. Britti, F. Vitale, and R. Del Maso, "Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin," *Veterinary Record*, vol. 156, no. 11, pp. 346–349, 2005.
 - [23] P. Bianciardi, A. Fasanello, V. F. Manzillo et al., "The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis," *Parasitology Research*, vol. 93, no. 6, pp. 486–492, 2004.
 - [24] S. Rougier, I. Vouldoukis, S. Fournel, S. Pérès, and F. Woehrlé, "Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: a pilot study," *Veterinary Parasitology*, vol. 153, no. 3–4, pp. 244–254, 2008.
 - [25] L. Hernández, R. Gálvez, A. Montoya et al., "First study on efficacy and tolerability of a new alkylphosphocholine molecule (oleylphosphocholine—OLPC) in the treatment of canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*," *Parasitology Research*, vol. 113, no. 1, pp. 157–164, 2014.
 - [26] P. Gómez-Ochoa, J. A. Castillo, M. Gascón, J. J. Zarate, F. Alvarez, and C. G. Couto, "Use of domperidone in the treatment of canine visceral *Leishmaniasis*: a clinical trial," *Veterinary Journal*, vol. 179, no. 2, pp. 259–263, 2009.
 - [27] J. D. Dutcher, M. B. Young, J. H. Sherman, W. Hibbits, and D. R. Walters, "Chemical studies on amphotericin B. I. Preparation of the hydrogenation product and isolation of mycosamine, an acetolysis product," *Antibiotics Annual*, pp. 866–869, 1956.
 - [28] G. Baneth and S. E. Shaw, "Chemotherapy of canine leishmaniosis," *Veterinary Parasitology*, vol. 106, no. 4, pp. 315–324, 2002.
 - [29] S. C. Kinsky, "Antibiotic interaction with model membranes," *Annual Review of Pharmacology*, vol. 10, pp. 119–142, 1970.
 - [30] F. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu et al., "Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?" *Nature Reviews Microbiology*, vol. 5, no. 11, pp. 873–882, 2007.
 - [31] S. Sundar, P. K. Sinha, M. Rai et al., "Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: An open-label, non-inferiority, randomised controlled trial," *The Lancet*, vol. 377, no. 9764, pp. 477–486, 2011.
 - [32] J. D. Berman, G. Ksionski, W. L. Chapman, V. B. Waits, and W. L. Hanson, "Activity of amphotericin B cholesterol dispersion (Amphocil) in experimental visceral leishmaniasis," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 36, no. 9, pp. 1978–1980, 1992.
 - [33] R. Laniado-Laborín and M. N. Cabrales-Vargas, "Amphotericin B: side effects and toxicity," *Revista Iberoamericana de Micología*, vol. 26, no. 4, pp. 223–227, 2009.
 - [34] P. Ciaramella and M. Corona, "Canine leishmaniasis: therapeutic aspects," *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, vol. 25, pp. 370–375, 2003.
 - [35] P. M. Daftarian, G. W. Stone, L. Kovalski et al., "A targeted and adjuvanted nanocarrier lowers the effective dose of liposomal amphotericin B and enhances adaptive immunity in murine cutaneous leishmaniasis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 208, no. 11, pp. 1914–1922, 2013.
 - [36] J. A. Sánchez-Brunete, M. A. Dea, S. Rama et al., "Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 48, no. 9, pp. 3246–3252, 2004.
 - [37] O. Cortadellas, "Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis," *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 17, no. 6, pp. 808–812, 2003.
 - [38] J. Moreno, J. Nieto, C. Chamizo et al., "The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy," *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 71, no. 3–4, pp. 181–195, 1999.
 - [39] R. Espada, S. Valdespina, G. Molero, M. A. Dea, M. P. Ballesteros, and J. J. Torrado, "Efficacy of alternative dosing regimens of poly-aggregated amphotericin B," *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 32, no. 1, pp. 55–61, 2008.
 - [40] K. Bartlett, E. Yau, S. C. Hartsel et al., "Effect of heat-treated amphotericin B on renal and fungal cytotoxicity," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 48, no. 1, pp. 333–336, 2004.
 - [41] E. W. M. van Etten, W. van Vianen, P. Roovers, and P. Frederik, "Mild heating of amphotericin B-desoxycholate: effects on ultrastructure, in vitro activity and toxicity, and therapeutic efficacy in severe candidiasis in leukopenic mice," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 44, no. 6, pp. 1598–1603, 2000.
 - [42] A. H. A. Mohamed-Ahmed, K. A. Les, K. Seifert, S. L. Croft, and S. Brocchini, "Noncovalent complexation of amphotericin-B with poly(α -glutamic acid)," *Molecular Pharmaceutics*, vol. 10, no. 3, pp. 940–950, 2013.
 - [43] R. Espada, S. Valdespina, M. A. Dea et al., "In vivo distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 61, no. 5, pp. 1125–1131, 2008.
 - [44] F. Gaboriau, M. Chéron, C. Petit, and J. Bolard, "Heat-induced superaggregation of amphotericin B reduces its in vitro toxicity: a new way to improve its therapeutic index," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 41, no. 11, pp. 2345–2351, 1997.
 - [45] L. Hernández, A. Montoya, R. Checa et al., "Course of experimental infection of canine leishmaniosis: follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques," *Veterinary Parasitology*, vol. 207, no. 1–2, pp. 149–155, 2015.
 - [46] R. Espada, S. Valdespina, C. Alfonso, G. Rivas, M. P. Ballesteros, and J. J. Torrado, "Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 361, no. 1–2, pp. 64–69, 2008.

- [47] F. Mancianti and N. Meciani, "Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis," *The American Journal of Veterinary Research*, vol. 49, no. 8, pp. 1409–1411, 1988.
- [48] WHO, "Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis," WHO Technical Report Series, WHO, Geneva, Switzerland, 2010.
- [49] J. P. Dedet, F. Pratlong, R. Pradinaud, and B. Moreau, "Delayed culture of *Leishmania* in skin biopsies," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 93, no. 6, pp. 673–674, 1999.
- [50] O. Francino, L. Altet, E. Sánchez-Robert et al., "Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis," *Veterinary Parasitology*, vol. 137, no. 3–4, pp. 214–221, 2006.
- [51] F. Dantas-Torres, M. S. Latrofa, and D. Otranto, "Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*," *Parasites and Vectors*, vol. 4, no. 1, article 56, 2011.
- [52] M. Hommel, C. L. Jaffe, B. Travi, and G. Milon, "Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines," *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 89, supplement 1, pp. 55–73, 1995.
- [53] J. Fernández-Cotrina, V. Iniesta, S. Belinchón-Lorenzo et al., "Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniasis by *Leishmania infantum*," *Veterinary Parasitology*, vol. 192, no. 1–3, pp. 118–128, 2013.
- [54] J. Poot, M. E. Rogers, P. A. Bates, and A. Vermeulen, "Detailed analysis of an experimental challenge model for *Leishmania infantum* (JPC strain) in dogs," *Veterinary Parasitology*, vol. 130, no. 1–2, pp. 41–53, 2005.
- [55] B. L. Travi, E. Y. Osorio, O. A. Saldarriaga et al., "Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived *Leishmania chagasi* promastigotes," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 81, no. 6, pp. 994–1003, 2009.
- [56] A. Rodríguez-Cortés, A. Ojeda, L. López-Fuertes et al., "A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis," *International Journal for Parasitology*, vol. 37, no. 6, pp. 683–693, 2007.
- [57] L. Solano-Gallego, A. Koutinas, G. Miró et al., "Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis," *Veterinary Parasitology*, vol. 165, no. 1–2, pp. 1–18, 2009.
- [58] J. A. Sánchez-Brunete, M. A. Dea, S. Rama et al., "Amphotericin B molecular organization as an essential factor to improve activity/toxicity ratio in the treatment of visceral leishmaniasis," *Journal of Drug Targeting*, vol. 12, no. 7, pp. 453–460, 2004.
- [59] D. R. Serrano, L. Hernández, L. Fleire et al., "Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 447, no. 1–2, pp. 38–46, 2013.
- [60] I. Bekersky, G. W. Boswell, R. Hiles, R. M. Fielding, D. Buell, and T. J. Walsh, "Safety and toxicokinetics of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) in beagle dogs," *Pharmaceutical Research*, vol. 16, no. 11, pp. 1694–1701, 1999.
- [61] M. Pierantozzi, X. Roura, S. Paltrinieri, M. Poggi, and A. Zatelli, "Variation of proteinuria in dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate and allopurinol: a retrospective study," *Journal of the American Animal Hospital Association*, vol. 49, no. 4, pp. 231–236, 2013.
- [62] S. Martínez-Subiela, L. J. Bernal, and J. J. Cerón, "Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniasis during short-term treatment," *The American Journal of Veterinary Research*, vol. 64, no. 8, pp. 1021–1026, 2003.
- [63] L. V. Athanasiou, M. N. Saridomichelakis, V. I. Kontos, G. Spanakos, and T. S. Rallis, "Treatment of canine leishmaniasis with aminosidine at an optimized dosage regimen: a pilot open clinical trial," *Veterinary Parasitology*, vol. 192, no. 1–3, pp. 91–97, 2013.
- [64] V. Woerly, L. Maynard, A. Sanquer, and H.-M. Eun, "Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniasis," *Parasitology Research*, vol. 105, no. 2, pp. 463–469, 2009.
- [65] J. Carcelén, V. Iniesta, J. Fernández-Cotrina et al., "The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection," *Vaccine*, vol. 27, no. 43, pp. 5964–5973, 2009.
- [66] A. C. Rosypal, G. C. Troy, R. B. Duncan, A. M. Zajac, and D. S. Lindsay, "Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum*," *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 19, no. 6, pp. 802–809, 2005.
- [67] P. Abranches, G. Santos-Gomes, N. Rachamim, L. Campino, L. F. Schnur, and C. L. Jaffe, "An experimental model for canine visceral leishmaniasis," *Parasite Immunology*, vol. 13, no. 5, pp. 537–550, 1991.
- [68] E. Pinelli, R. Killick-Kendrick, J. Wagenaar, W. Bernadina, G. Del Real, and J. Ruitenber, "Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*," *Infection and Immunity*, vol. 62, no. 1, pp. 229–235, 1994.
- [69] A. B. Reis, O. A. Martins-Filho, A. Teixeira-Carvalho et al., "Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis," *Research in Veterinary Science*, vol. 81, no. 1, pp. 68–75, 2006.
- [70] S. Rougier, L. Hasseine, P. Delaunay, G. Michel, and P. Marty, "One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniasis," *Veterinary Parasitology*, vol. 186, no. 3–4, pp. 245–253, 2012.
- [71] A. F. Koutinas, M. N. Saridomichelakis, M. E. Mylonakis et al., "A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis," *Veterinary Parasitology*, vol. 98, no. 4, pp. 247–261, 2001.
- [72] I. Amusatogui, A. Sainz, and M. A. Tesouro, "Effects of antimonial therapy for canine leishmaniasis on antibody titer," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 849, pp. 444–446, 1998.
- [73] M. Torres, M. Bardagi, X. Roura, G. Zanna, I. Ravera, and L. Ferrer, "Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniasis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol," *Veterinary Journal*, vol. 188, no. 3, pp. 346–351, 2011.
- [74] L. Ferrer, M. J. Aisa, X. Roura, and M. Portús, "Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis," *Veterinary Record*, vol. 136, no. 20, pp. 514–516, 1995.
- [75] L. Solano-Gallego, P. Morell, M. Arboix, J. Alberola, and L. Ferrer, "Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 39, no. 2, pp. 560–563, 2001.

- [76] V. Martínez, J. Quilez, A. Sanchez, X. Roura, O. Francino, and L. Altet, "Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation," *Parasites and Vectors*, vol. 4, article 57, 2011.
- [77] J. Alvar, C. Cañavate, R. Molina, J. Moreno, and J. Nieto, "Canine leishmaniasis," *Advances in Parasitology*, vol. 57, pp. 1–88, 2004.
- [78] L. Ferrer, "Clinical aspects of canine leishmaniosis: an update," in *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*, pp. 6–10, Hoechst Roussel Vet, Barcelona, Spain, 1999.
- [79] C. Maia and L. Campino, "Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection," *Veterinary Parasitology*, vol. 158, no. 4, pp. 274–287, 2008.
- [80] P. F. Quaresma, S. M. F. Murta, E. de Castro Ferreira, A. C. V. M. da Rocha-Lima, A. A. P. Xavier, and C. M. F. Gontijo, "Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR," *Acta Tropica*, vol. 111, no. 3, pp. 289–294, 2009.
- [81] L. Manna, S. Reale, E. Viola et al., "*Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs," *Veterinary Parasitology*, vol. 142, no. 3–4, pp. 271–280, 2006.
- [82] L. Manna, S. Reale, E. Picillo, F. Vitale, and A. E. Gravino, "Urine sampling for real-time polymerase chain reaction-based diagnosis of canine leishmaniasis," *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, vol. 20, no. 1, pp. 64–67, 2008.
- [83] L. Solano-Gallego, A. Rodriguez-Cortes, M. Trotta et al., "Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis," *Veterinary Parasitology*, vol. 147, no. 3–4, pp. 315–319, 2007.
- [84] A. Franceschi, V. Merildi, G. Guidi, and F. Mancianti, "Occurrence of leishmania DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis," *Veterinary Research Communications*, vol. 31, no. 3, pp. 335–341, 2007.

4.3. Objetivo 3: Conocer la eficacia leishmanicida y la tolerancia de la administración oral de una formulación a base de oleilfosfocolina (OIPC) en el tratamiento de la leishmaniosis canina en perros con infección natural, evaluando la evolución clínica de los animales post-tratamiento.

Como alternativa a los antimoniales pentavalentes se emplea desde la última década la miltefosina, una alquilfosfocolina (Manna *et al.*, 2009; Mateo *et al.*, 2009; Miró *et al.*, 2009). En perros enfermos, la miltefosina muestra una buena eficacia clínica y parasitológica tras su administración oral (Mateo *et al.*, 2009), la cual se incrementa cuando se administra de manera conjunta con alopurinol (Manna *et al.*, 2009; Miró *et al.*, 2009). Los efectos adversos descritos son, principalmente, alteraciones gastrointestinales leves (náuseas, anorexia, vómitos y diarrea) autolimitantes, que disminuyen si se administra junto con la comida (Mateo *et al.*, 2009).

Recientemente se ha desarrollado una nueva alquilfosfocolina, la OIPC. Se trata de un análogo estructural de la miltefosina, también biodisponible por v.o., cuya elaboración es más económica, y que ha mostrado unos resultados preliminares prometedores en el tratamiento de la infección por *Leishmania* spp. en el modelo murino (Fortin *et al.*, 2012). Con respecto a la miltefosina ha demostrado poseer una mayor eficacia leishmanicida y una biodisponibilidad oral y tolerancia superiores (Fortin *et al.*, 2012).

Con el presente estudio preliminar se ha pretendido valorar la eficacia clínica y leishmanicida de la OIPC en el tratamiento de la infección natural por *L. infantum* en ocho perros de diferentes razas y edades, así como su tolerancia. Los resultados obtenidos mostraron una recuperación clínica muy favorable y rápida en términos de reducción de la puntuación

clínica y ganancia de peso, encontrándose una asociación entre dicha eficacia clínica y un descenso en la carga parasitaria presente en MO. En términos de tolerancia, no se produjeron efectos adversos graves, observándose únicamente efectos gastrointestinales leves y transitorios en algunos perros, de manera similar a lo descrito con la miltefosina. Además, este estudio ha demostrado que la OIPC requiere un periodo de administración más corto que la miltefosina (10-15 días).

Publicación científica:

Hernández, L., Gálvez, R., Montoya, A., Checa, R., Bello, A., Bosschaerts, T., Jansen, H., Rupérez, C., Fortin, A. and Miró, G. (2014). First study on efficacy and tolerability of a new alkylphosphocholine molecule (oleyphosphocholine-OIPC) in the treatment of canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Parasitol Res*, 113, 157-164.

First study on efficacy and tolerability of a new alkylphosphocholine molecule (oleylphosphocholine—OIPC) in the treatment of canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*

Leticia Hernández · Rosa Gálvez · Ana Montoya · Rocio Checa · Alba Bello · Tom Bosschaerts · Herwig Jansen · Cristina Rupérez · Anny Fortin · Guadalupe Miró

Received: 8 July 2013 / Accepted: 2 October 2013 / Published online: 6 November 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The alkylphosphocholine oleylphosphocholine (OIPC) represents a potential new therapy for the treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum*. The aim of the present study was to evaluate the efficacy and safety of OIPC in a small cohort of dogs naturally infected with *L. infantum* and defined as clinically sick (LeishVet stages II and III). A total of eight dogs were included in the study and were treated orally with 4 mg/kg OIPC for 14 days. Dogs were assessed at the clinical and parasitological level at four time points during a total follow-up period of 90 days (before treatment and at 15, 30, and 90 days post-treatment onset). Ln-PCR, real-time quantitative PCR, antibody testing (IFAT), and culture of bone marrow aspirates were evaluated at the four time points. OIPC treatment induced a rapid and satisfactory clinical recovery in terms of clinical score reduction and weight gain, and treatment efficacy was found to be associated with a decrease in bone marrow parasitic load. Serological titers measured by IFAT were stable in any of the treated dogs at any time point after treatment. OIPC was well tolerated and no severe adverse events were noted in any of the treated dogs; even some dogs showed slight intestinal disorders. This proof-of-principle study is the first to show that short oral treatment with OIPC improves clinical signs of canine *L. infantum* leishmaniosis, highlighting the need to perform additional

studies to optimize the dosing regimen and to assess long-term treatment efficacy of this drug.

Introduction

Canine leishmaniosis (CanL) is a severe zoonotic disease caused by protozoan parasites of the *Leishmania* genus that are transmitted to humans and animals by blood-sucking phlebotomine sandflies (Killick-Kendrick 1990; Ashford 2000). CanL is endemic in more than 80 countries in the world, being present in regions of southern Europe, Africa, Asia, and South and Central America (Baneth et al. 2008). In the Mediterranean basin, CanL is essentially caused by *Leishmania infantum*, and dogs are considered the main reservoir of *L. infantum* for humans (Gramiccia and Gradoni 2005). CanL is a systemic disease manifested by variable and nonspecific clinical signs and degrees of severity, due to the individual host immune response (Baneth et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2009). A system of four clinical stages based on clinical signs, clinicopathological abnormalities, and serological status was proposed by the LeishVet group in an effort to cover the wide variety of clinical manifestations and provide a tool to determine the best treatment protocol and prognoses for each stage (Solano-Gallego et al. 2011).

Several drugs and dosage regimens have been used for the treatment of CanL with variable efficacy, and a scientific agreement on the management of the disease exists (Oliva et al. 2010; Solano-Gallego et al. 2011; Woerly et al. 2009). Currently used antileishmanial drugs improve clinical signs after treatment (Noli and Auxilia 2005), but they do not result in parasitological cure, hereby making post-treatment relapses frequent, and in some cases they are associated with toxicity (Miró et al. 2008; Amusategui et al. 1998; Oliva et al. 2010).

L. Hernández · R. Gálvez · A. Montoya · R. Checa · A. Bello · C. Rupérez · G. Miró (✉)
Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria,
Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n,
28040 Madrid, Spain
e-mail: gmiro@ucm.es

T. Bosschaerts · H. Jansen · A. Fortin
Dafra Pharma R&D, Slachthuisstraat 30/7, 2300 Turnhout, Belgium

Furthermore, the drug most widely used in the treatment of CanL is meglumine antimoniate, which is threatened by the onset of resistance (Gramiccia et al. 1992; Murray 2001). The combination of meglumine antimoniate with allopurinol (a purine analogue with leishmanistatic activity) is still considered the most effective therapy (Noli and Auxilia 2005; Denerolle and Bourdoiseau 1999) and is used as the first line protocol against the disease (Solano-Gallego et al. 2009).

As a recent alternative to pentavalent antimony, the alkylphosphocholine miltefosine is also used, particularly in dogs with renal disease (Mateo et al. 2009; Manna et al. 2009; Miró et al. 2009). Miltefosine was originally developed as an anti-cancer agent and was later repositioned to treat leishmaniosis (Sindermann and Engel 2006). In sick dogs, the drug shows a good clinical and parasitological efficacy after oral administration (Mateo et al. 2009), which increases when given together with allopurinol (Manna et al. 2009; Miró et al. 2009). Miltefosine shows minor adverse effects consisting of dysorexia, self-limited vomiting, or diarrhea, which diminish if combined with food. Other antileishmanial treatment options include amphotericine B (currently restricted to humans to avoid future cross-resistance), aminosidine, pentamidine, metronidazole, ketoconazole, and fluoroquinolones; however, they are currently not recommended for the routine treatment of CanL as first option (Solano-Gallego et al. 2009; Solano-Gallego et al. 2011; Manna et al. 2009). More recently, the administration of domperidone in dogs has been claimed to activate their cell-mediated immune response by increasing blood levels of prolactin (Gómez-Ochoa et al. 2009), and may be useful as an immunomodulator in the treatment of non-severe clinical cases.

Based on these observations, it is clear that new molecules and protocols should continue to be developed in order to improve treatment efficacy and ease of administration, reduce toxicity, and avoid the appearance of resistance.

Olethylphosphocholine (OIPC) belongs to the chemical group of the alkylphosphocholines and is a structural analogue of miltefosine, the most recently marketed drug for the treatment of leishmaniosis. OIPC has proven antileishmanial activity both in vitro and in experimental animal models. Preclinical testing in the *L. infantum* hamster model has shown that OIPC has higher efficacy compared to miltefosine after oral administration (Fortin et al. 2012). OIPC has excellent oral bioavailability and is a long-acting drug, with a mean elimination half-life of about 60 h in healthy dogs (Fortin et al. 2013).

The present pilot study aimed to evaluate the efficacy and safety of OIPC in a small cohort of dogs naturally infected with *L. infantum* that were defined clinically sick. Safety studies in healthy dogs have indicated that OIPC can be given orally at a dose of 4 mg/kg/day for 28 days without causing significant adverse events (Fortin et al. 2013). As a conservative approach,

the dose of 4 mg/kg was administered for 14 days in clinically sick dogs to assess treatment efficacy. Clinical remission, improvement of clinicopathological abnormalities, evolution of antibody titers, and blood and bone marrow parasitic load by cytological and PCR assays were followed up before (D0) and after treatment on day 15 (D15), day 30 (D30), and day 90 (D90), representing the end of the study).

Materials and methods

Animals

A cohort of 8 shelter dogs (numbered from 1 to 8) naturally infected with *L. infantum* were selected based on inclusion and exclusion criteria described below. Selected dogs were different breeds and both sexes with ages over 6 months.

The study was carried out in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. A representative of the shelter assumed the signature of the owner consent in all the clinical cases included.

Study design

Dogs were included in the study if they met all the following inclusion criteria:

- At least two clinical signs consistent with CanL: asthenia/loss of weight, cutaneous lesions, lymphadenomegaly/splenomegaly, epistaxis—sporadic or persistent (unilateral or bilateral), ocular lesions.
- Positive diagnosis confirmed by at least two laboratory tests: indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) for leishmaniosis-specific antibodies (cut-off 1:100), cultures of bone marrow aspirates grown in Novy–Nicolle–McNeal (NNN) medium or bone marrow smear examination, nested-polymerase chain reaction (Ln-PCR) of blood or bone marrow aspirates.

Dogs with CanL were excluded if they fulfilled one of the exclusion criteria:

- Healthy or asymptomatic dogs, or currently under treatment with other leishmanicide drugs or corticosteroids
- Concomitant infectious or vector-borne disease
- Pregnant or lactating bitches
- Severe renal, hepatic, or cardiac failure
- Development of deep pyoderma infections

After inclusion, dogs were removed from the study if they met at least one of the post-inclusion removal criteria: failure to comply with study protocol, use of forbidden treatment, adverse events requiring interruption of drug treatment or

follow-up, and secondary infections or disorders interfering with drug treatment.

Dogs were assessed at the clinical (physical examination and clinicopathological abnormalities) and parasitological level five times throughout the study: at time of inclusion (on approx. day -15), before starting treatment (D0) and at day 15 (D15), day 30 (D30), and day 90 (D90).

Treatment

The drug used was oleylphosphocholine (OIPC), an alkylphosphocholine analogue (Fig. 1). The used dosing regimen was 4 mg/kg/day of a liposomal OIPC formulation (18 mg/kg, prepared as described in Fortin et al. 2012 and provided by Dafra Pharma R&D) during 14 days (day 1 to day 14 inclusively), administered by oral administration *a fortiori* by the investigator.

Sample collection and clinical and laboratory diagnostics

At each time point (i.e., D0, D15, D30, and D90), animals were scored for 25 clinical signs assessed in a physical examination using a categorized scoring system from 0 to 3, as previously described (Mateo et al. 2009; Manna et al. 2009; Miró et al. 2009). Bone marrow aspirates as well as blood samples of 5–6 ml obtained by cephalic venipuncture were collected from each dog. The collected blood was divided over four tubes containing: (a) lithium heparin for biochemical profile, (b) EDTA for CBC (complete blood count), (c) EDTA for *Leishmania* specific Ln-PCR or real-time quantitative PCR (RTQ-PCR) analysis, and (d) no additives for antibody testing (IFAT). Analysis of the biochemical profile and full blood counts was done at a clinical testing laboratory. The blood samples for PCR were stored frozen at -20 °C until processing; the samples for IFAT testing were kept at 4 °C and immediately analyzed.

Biochemical parameters assessing renal and hepatic profile were urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total plasma protein, albumin/globulin ratio, and serum protein electrophoresis. CBC parameters tested were red blood cell count (RBCC), packed cell volume (PCV), white blood cell count (WBCC), and platelet count. Urine samples were also collected from each dog to perform a complete urinalysis and to monitor protein/creatinine ratio.

The indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) for antileishmanial specific immunoglobulin G (IgG) antibodies

was performed against in-house cultured promastigotes as described previously (Mancianti and Meciani 1988), using the cut-off 1/100. The serial dilutions ranged from 1/50 to 1/6,400.

Determination of parasitemia

The leishmanicidal efficacy of treatment was assessed by microscopically examining the presence of *Leishmania* amastigotes on three Giemsa-stained bone marrow smears and bone marrow cultures, and performing Ln-PCR analysis on blood samples and bone marrow aspirates at every time point. Selective culture of bone marrow aspirates was prepared on Novy–McNeal–Nicolle medium (NNN). All bone marrow smears were analyzed by the same qualified and specialized parasitologist.

The blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) was used to obtain DNA from whole blood samples and bone marrow aspirates, according to the manufacturer's instructions. Twenty microliters of DNA sample was subjected to Ln-PCR with primers targeting the *Leishmania* SSUrRNA (small subunit ribosomal ribonucleic acid) region. This protocol is *Leishmania* genus specific and uses the primers R221 (5'-GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG-3') and R332 (5'-GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG-3') in the first reaction, and the primers R223 (5'-TCC CAT CGC AAC CTC GGT T-3') and R333 (5'-AAA GCG GGC GCG GTG CTG-3') in the nested reaction (Cruz et al. 2002).

RTQ-PCR was performed on blood and bone marrow samples from D0 and D90. The RTQ-PCR analysis was performed using LightCycler high speed thermal cycler and the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics, Spain). Primers used for specific amplification of *Leishmania* were R223 and R333 (van Eys et al. 1992). Reactions were carried out in a final volume of 20 µl of reaction mixture containing 15 pmol/µl of primer R223 and R333 (SIGMA-GENOSYS) and 4 µl of target DNA. The thermal cycling conditions were; initial denaturation at 95 °C for 10 min, 35 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 20 s, annealing at 65 °C for 20 s, extension at 72 °C for 20 s. After PCR amplification, a melting curve was generated to check the amplicon specificity (1 cycle at 95 °C for 20 s, followed by heating to 70 °C for 20 s and continuous heating at 0.01 °C/s to 95 °C). Each sample was tested in duplicate for each run. Quantification was by means of a standard curve which consisted of serial dilutions of *L. infantum* DNA, ranging from the equivalent of 10⁵ up to 10² parasites/ml.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Stata v. 10.1 software (StataCorp LP, College Station, Texas, USA). Mean differences in outcome variables between the different days post-treatment

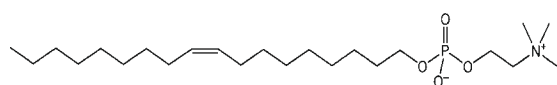


Fig. 1 Chemical structure of OIPC

were compared by repeated measures of ANOVA. For the categorical variables, Wilcoxon Test were used, Signed Rank or Student's *t* depending on normal distribution of variables. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

Results

Clinical efficacy

A total of eight *L. infantum* naturally infected shelter dogs were included in the study, their baseline characteristics before treatment start (D0) and at the end of the follow-up period (D90), are summarized in Table 1. Based on a recent proposed clinical classification of CanL by the Leishvet group (Solano-Gallego et al. 2011), all dogs enrolled were classified as stage II clinical leishmaniosis, with the exception of dog 3 and 5 classified as stage III. These two dogs presented azotemia and proteinuria prior to treatment administration but not a severe clinical picture, which was considered compatible with the inclusion criteria. On D0, dogs showed a mean clinical score of 18.0 ± 5.7 points (mean \pm standard deviation; Fig. 2). Observed clinical signs were mainly lymphadenomegaly, which was the most frequent clinical sign observed before treatment (87.5 %), followed by cutaneous lesions (87.5 %) and general amyotrophy (75.0 %). Assessment of the clinical disease course after treatment with OIPC showed a clear improvement in terms of reduction in the mean clinical scoring. Mean scores for D15, D30 and D90 dropped to 10.9 ± 3.2 , 5.3 ± 3.8 and 1.8 ± 1.8 , respectively, reducing the clinical score significantly compared to D0 (Fig. 2). Of note, two out of eight dogs presented a complete absence of clinical signs on D90 (dogs 5 and 7). In parallel to the clinical improvement seven dogs gained weight after OIPC treatment (Fig. 2), with a mean percentage weight change compared to

D0 of -2.3 ± 3.2 %, 1.0 ± 6.5 %, and 9.9 ± 8.6 % on D15, D30 and D90, respectively. Overall, the clinical recovery of the included dogs was deemed very positive in terms of weight gain and clinical improvement, translating into a good preliminary clinical efficacy.

Tolerance assessment

Regarding tolerance, two out of eight dogs experienced diarrhea during the first week of treatment, and one dog had diarrhea and one episode of vomiting. No symptomatic treatment was necessary in any of the affected dogs. The other five dogs tolerated OIPC treatment without any side effect.

Hematology, biochemistry, and serology

Mean CBC values did not change significantly during the study, nor were there any significant differences observed for mean serum concentration of protein, urea, creatinine, ALP, or ALT (not shown). Of note, urea and creatinine values of dogs 3 and 5 with stage III disease on D0, were normalized on D90 although they kept being proteinuric.

A significant increase of the mean albumin/globulin ratio was observed after treatment, from 0.30 ± 0.12 on D0 to 0.50 ± 0.18 , 0.60 ± 0.16 0.6, and 0.52 ± 0.17 on D15, D30, and D90, respectively ($p < 0.05$ for all time points compared to D0).

Serological testing using the indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) detected *L. infantum* specific antibodies in serum dilutions ranging from 1/200 to 1/1,600 on D0 (Table 1). No important seroreversion was observed in any of the treated dogs at any time point after treatment, with sera ranging from 1/400 to 1/1,600 on D90.

Parasitemia

Out of six dogs tested on D0, microscopic examination was positive in two dogs and bone marrow culture was positive in three dogs (one animal was positive for both methods; Table 2). On D90, microscopic examination was positive in four out of six dogs tested and bone marrow culture was positive in two dogs (two animals were positive for both methods), indicating that full parasitological clearance was not achieved at the end of the follow-up period. In accordance, nested-polymerase chain reaction (Ln-PCR) analysis on bone marrow aspirates and/or blood samples confirmed that on D90 most dogs scored positive for *L. infantum* DNA (six out of seven dogs tested scored positive for blood and/or bone marrow; Table 2). It can be noted that although blood samples were rarely found PCR positive in the two weeks following treatment (zero out of seven tested on D15, one out of eight tested on D30), this was not the case for bone marrow aspirates (six out of seven on D15, three out of seven on

Table 1 Animal and clinical characteristics at D0 and D90 IFAT: indirect immunofluorescence antibody test

Dog	Sex	Clinical staging ^a	IFAT		Weight (kg)		Clinical scoring	
			D0	D90	D0	D90	D0	D90
1	F	II	1/1,600	1/1,600	4.7	5.6	18	2
2	M	II	1/1,600	1/1,600	22.5	22.5	18	5
3	F	III	1/1,600	1/800	39.9	43.5	17	2
4	F	II	1/800	1/800	21.5	22.2	12	8
5	F	III	1/400	1/400	13.8	14.0	14	0
6	F	II	1/200	1/800	38.4	46.0	31	2
7	F	II	1/400	1/800	29.5	32.2	17	0
8	M	II	1/400	1/400	13.5	15.2	17	5

F female, M male

^a Based on Solano-Gallego et al. (2011)

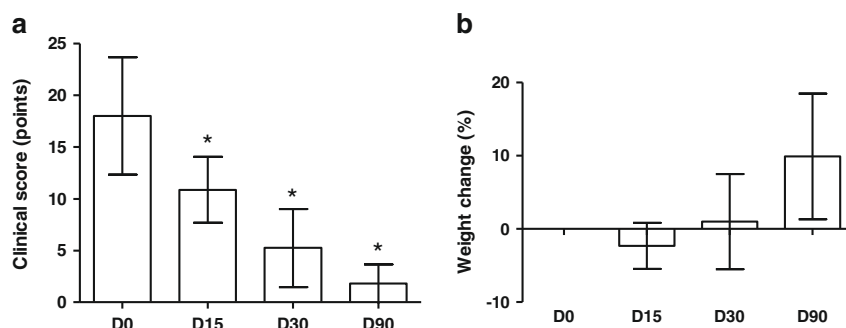


Fig. 2 Mean clinical score (a) and percentage weight change (b) at the different time points of follow-up. Dogs were weighed and clinic score was assessed based on a scoring system previously described (Mateo et al. 2009; Manna et al. 2009; Miró et al. 2009). Percentage weight change was

calculated for each individual dog relative to the dog's weight at baseline (D0). Mean and standard deviation are shown. *Single asterisk* indicates significantly lower compared to day 0 ($p=0.023$ on D15, $p=0.023$ on D30, $p=0.094$ on D90)

D30), suggesting the parasites remain latently present in the bone marrow.

Bone marrow and blood samples found positive by Ln-PCR on D0 and D90 were analyzed further using real-time quantitative PCR (RTQ-PCR). Quantification of parasitemia was by means of a standard curve which consisted of serial dilutions of *L. infantum* DNA. This analysis revealed a mean *L. infantum* parasite load decrease of more than 95 % in the bone marrow on D90 as compared to D0 (four dogs tested on D0 and five dogs tested on D90; Fig. 3). RTQ-PCR analysis did not reliably detect significant levels of parasites in blood samples in this study.

Discussion

With the aim of improving and simplifying current management of CanL, this study investigated the safety and efficacy of an innovative therapy with OIPC in a small cohort of naturally *L.*

infantum infected dogs. OIPC is an orally bioavailable alkyolphosphocholine that is structurally related to miltefosine (Fortin et al. 2012). In the experimental *L. infantum* hamster model, OIPC is more effective than miltefosine in reducing parasite load in target organs after both single or multiple oral dosing (Fortin et al. 2012). This study is the first to evaluate the use of OIPC in a natural model of leishmaniasis. A treatment dose of 4 mg/kg OIPC was selected, given once daily via the oral route. Safety data in healthy beagle have indicated that this dose does not induce adverse events, even after 4-week daily administration (Fortin et al. 2013). However, to avoid treatment-associated toxicity in clinically sick dogs, in this proof-of-principle study treatment duration was limited to 2 weeks.

A total of eight dogs fulfilled the inclusion/exclusion criteria and were included in the study. All dogs responded well to treatment in terms of clinical improvement, and all clinical manifestations of CanL showed a tendency for reduced frequency and severity, including cutaneous lesions, such as seborrheic dermatitis, ulcerative cutaneous forms, hyperkeratosis

Table 2 Parasitological results on bone marrow aspirates and blood samples

Dog	Bone marrow cytology				Bone marrow culture				Blood Ln-PCR				Bone marrow Ln-PCR			
	D0	D15	D30	D90	D0	D15	D30	D90	D0	D15	D30	D90	D0	D15	D30	D90
1	nd	nd	nd	+	nd	nd	+	–	+	–	+	+	–	nd	nd	+
2	–	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+
3	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	+	+	–	nd	+	+	–	nd	+	–	–	+	+	+	–	+
5	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	nd	+	–	+
6	–	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	nd	+	+	+	+
7	+	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	+	+	+	–	–
8	nd	+	+	nd	nd	–	–	nd	nd	nd	–	nd	nd	+	+	nd

Microscopical analysis of Giemsa-stained smears of bone marrow aspirates (bone marrow cytology) and bone marrow cultures, and nested PCR (Ln-PCR) analysis on blood samples and bone marrow aspirates was performed at the indicated time points

+ positive result, – negative result, nd not done

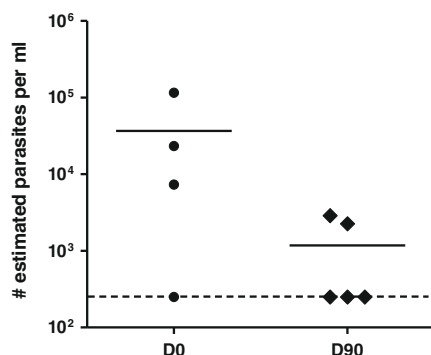


Fig. 3 Quantitative PCR (RTQ-PCR) analysis of parasitemia in bone marrow parasites. Bone marrow aspirates positive by Ln-PCR on D0 and D90 were selected for further analysis by RTQ-PCR to quantify parasitic loads by means of a standard curve consisting of serial dilutions of *L. infantum* DNA. Individual measurements are represented by circles and squares. On D0 and D90 respectively, one and three samples were below the detection limit of the assay (250 parasites/ml, dotted line on graph). To conservatively estimate the mean, these samples were set at the detection limit level. Horizontal lines indicate the estimated mean (mean±standard deviation: 36,715±537.29 and 1,179±129.1 for D0 and D90, respectively)

and alopecia, present in several dogs at time of inclusion. Similar efficacy results have been obtained in studies with aminosidine (Athanasίου et al. 2013), meglumine antimoniate and allopurinol combination (da Silva et al. 2012; Miro et al. 2011), miltefosine (Manna et al. 2009; Mateo et al. 2009; Bianciardi et al. 2004), and amphotericin B (Lamothe 2001). In addition, bodyweight of most dogs increased along the study period, correlating with the observed clinical improvement.

In terms of tolerance, five out of eight dogs did not experience side effects, whereas in the other three dogs occasional episodes of mild gastrointestinal disorders such as diarrhea and vomiting were observed.

Besides a significant increase in the mean A/G ratio, no significant changes in hematological or biochemical parameters were observed during the 3-month follow-up period. Serological titers measured by IFAT were also stable over time, and none of the dogs became seronegative at the end of the study. Therefore, no correlation between the IFAT titers and clinical improvement was found. These results are similar to previously published data on other antileishmanial drugs including miltefosine, and suggest that serological assessment as unique parameter is unsuitable to evaluate recovery and follow-up of treated dogs in the short term (Solano-Gallego et al. 2001; Pennisi et al. 2005; Mateo et al. 2009; Miró et al. 2008). Since *L. infantum* specific antibody titers may only decrease after a time period longer than the 3-month duration of our study, a longer follow-up could be needed to evaluate the kinetics of antibody titers over time.

Although microscopical analysis of bone marrow smears is a rapid and widely used field technique for the detection of

Leishmania amastigotes, it has a low sensitivity of 60–75 % in bone marrow (Alvar et al. 2004), and it can also be unrewarding due to the low to moderate number of parasites present in the sample (Moreira et al. 2007; Baneth and Aroch 2008). Detection of *Leishmania* kinetoplastid DNA (kDNA) by PCR is considered the most sensitive method for direct detection of infection in tissues (Maia et al. 2009; Miró et al. 2008; Maia and Campino 2008). In this study, all bone marrow smears were analyzed by the same qualified and specialized parasitologist. The number of dogs with positive bone marrow smears at the end of the study was four (out of six tested) and while a similar sensitivity was obtained with the bone marrow culture technique, both techniques showed an overall lower sensitivity in comparison with Ln-PCR. In this study, Ln-PCR identified six dogs (out of seven tested) positive for *L. infantum* DNA in bone marrow and/or blood samples at the end of follow-up, confirming that treatment with OIPC did not induce parasitological cure at the dosing regimen used. These results are similar to other recent studies using PCR, including studies with miltefosine (Miró et al. 2009; Manna et al. 2009) and meglumine antimoniate (Manna et al. 2008; Francino et al. 2006).

Following Ln-PCR analysis, RTQ-PCR was selected to determine in more detail the leishmanicide action of OIPC in tissues by determining the residual parasite burden on D90 as compared to D0 (Francino et al. 2006; Manna et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2007). RTQ-PCR has high sensitivity and specificity for the absolute quantification of *Leishmania* (Mortarino et al. 2004). This quantitative PCR analysis indicated that OIPC treatment reduced the mean parasite load in Ln-PCR-positive bone marrow samples by more than 95 %. RTQ-PCR analysis did not detect significant parasite burden in blood samples of D0 or D90, suggesting that blood is not as reliable as bone marrow samples to quantify *Leishmania* parasite burden (Maia et al. 2009; Manna et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2007).

None of the antileishmanial drugs currently used for CanL reliably induce parasitological cure since a small parasite load remains in the majority of cases (Martínez et al. 2011; Baneth and Shaw 2002), even though treated dogs show a good clinical response (Moreira et al. 2007). It has been previously suggested that dogs living in endemic areas may not attain parasitological cure after treatment (Miró et al. 2008; Baneth and Aroch 2008; Moreno and Alvar 2002).

The presence of residual parasites did not lead to clinical relapse in any of the dogs during the 3-month follow-up period, but this time-frame is considered too short to correctly assess this parameter. In this respect, studies on miltefosine have reported a progressive increase in the parasite load, especially 6 months after treatment (Andrade et al. 2011; Manna et al. 2008). Usually, this fact makes the need of repeating another treatment cycle. Synergistic action of leishmanicides in combination with allopurinol increases drug

efficacy (Manna et al. 2009; Miró et al. 2009; Noli and Auxilia 2005). In fact, miltefosine increases its efficacy when given together with allopurinol (Mateo et al. 2009; Miró et al. 2009). This synergy justifies the need for future studies on the clinical and parasitological efficacy of OIPC combined with allopurinol.

Conclusions

This proof-of-principle study indicates that OIPC can induce rapid clinical improvement in naturally *L. infantum* infected dogs without major side effects. Future comparative studies with larger animal groups, longer follow-up, and with or without a combination with allopurinol are now needed to identify the optimal dosing regimen (dose and treatment period) of OIPC as a new treatment option against CanL.

Acknowledgments The authors thank the Animal Protection shelter “ALBA” (<http://www.albaonline.org/>) for providing their facilities at each follow-up visit and all personnel involved in the daily care of the dogs during the study. We thank Dr. Israel Cruz from the World Health Organization Collaborating Center for Leishmaniasis, Instituto de Salud Carlos III, Spain, for his help on molecular analyses.

Conflict of interest This study was funded by Dafra Pharma R&D; AF and TB are employed by Dafra Pharma R&D.

References

- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J (2004) Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57:1–88. doi:10.1016/S0065-308X(04)57001-X
- Amusategui I, Sainz A, Tesouro MA (1998) Evolution of serum albumin/globulin ratio after antimonial therapy in canine leishmaniasis. *Ann N Y Acad Sci* 849:447–449
- Andrade HM, Toledo VP, Pinheiro MB, Guimarães TM, Oliveira NC, Castro JA, Silva RN, Amorim AC, Brandão RM, Yoko M, Silva AS, Dumont K, Ribeiro ML, Bartschewsky W, Monte SJ (2011) Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. *Vet Parasitol* 181:83–90. doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.009
- Ashford RW (2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30:1269–1281
- Athanasίου LV, Saridomichelakis MN, Kontos VI, Spanakos G, Rallis TS (2013) Treatment of canine leishmaniasis with aminosidine at an optimized dosage regimen: A pilot open clinical trial. *Vet Parasitol* 192:91–97. doi:10.1016/j.vetpar.2012.10.011
- Baneth G, Aroch I (2008) Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *Vet J* 175:14–15
- Baneth G, Shaw SE (2002) Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 106:315–324
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L (2008) Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: Part one. *Trends Parasitol* 24:324–330. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001
- Bianciardi P, Fasanella A, Foglia Manzillo V, Trotta T, Pagano A, Sorino S, Gradoni L, Oliva G (2004) The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. *Parasitol Res* 93:486–492. doi:10.1007/s00436-004-1170-0
- Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S, Alvar J (2002) A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96(Suppl 1): S185–S189
- Da Silva SM, Amorim IF, Ribeiro RR, Azevedo EG, Demicheli C, Melo MN, Tafuri WL, Gontijo NF, Michalick MS, Frézard F (2012) Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2858–2867. doi:10.1128/AAC.00208-12
- Denerolle P, Bourdoiseau G (1999) Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med* 13:413–415
- Fortin A, Hendrickx S, Yardley V, Cos P, Jansen H, Maes L (2012) Efficacy and tolerability of oleylphosphocholine (OIPC) in a laboratory model of visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 67:2707–2712. doi:10.1093/jac/dks273
- Fortin A, Bosschaerts T, Hernández L, Montoya A, Gálvez R, Dado D, Checa R, Bello A, Jansen H, Miró G (2013) Short oral treatment with oleylphosphocholine improves clinical canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a natural model of infection. *WordLeish 5 congress, Brazil*, p 342
- Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodríguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A, Roura X (2006) Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 137:214–221. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.011
- Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, Alvarez F, Couto CG (2009) Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet J* 179:259–263. doi:10.1016/j.tvjl.2007.09.014
- Gramiccia M, Gradoni L (2005) The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35: 1169–1180
- Gramiccia M, Gradoni L, Orsini S (1992) Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 86:613–620
- Killick-Kendrick R (1990) Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: A review. *Med Vet Entomol* 4:1–24
- Lamothe J (2001) Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract* 42: 170–175
- Maia C, Campino L (2008) Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158: 274–287
- Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L (2009) Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 179:142–144. doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.009
- Mancianti F, Meciani N (1988) Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. *Am J Vet Res* 49:1409–1411
- Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE (2008) Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J* 177:279–282
- Manna L, Vitale F, Reale S, Picillo E, Neglia G, Vescio F, Gravino AE (2009) Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. *Vet J* 182:441–445
- Martínez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L (2011) Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasit Vectors* 4:57. doi:10.1186/1756-3305-4-57

- Mateo M, Maynard L, Vischer C, Bianciardi P, Miró G (2009) Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniasis. *Parasitol Res* 105:155–162
- Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G (2008) Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 24:371–377. doi:10.1016/j.pt.2008.05.003
- Miró G, Oliva G, Cruz I, Cañavate C, Mortarino M, Vischer C, Bianciardi P (2009) Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. *Vet Dermatol* 20:397–404. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00824.x
- Miro G, Galvez R, Fraile C, Descalzo MA, Molina R (2011) Infectivity to phlebotomus perniciosus of dogs naturally parasitized with leishmania infantum after different treatments. *Parasit Vectors* 4: 52. doi:10.1186/1756-3305-4-52
- Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD (2007) Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 145:245–252
- Moreno J, Alvar J (2002) Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18:399–405
- Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C (2004) Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania. *Parassitologia* 46:163–167
- Murray HW (2001) Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2185–2197. doi:10.1128/AAC.45.8.2185-2197.2001
- Noli C, Auxilia ST (2005) Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: A systematic review. *Vet Dermatol* 16:213–232. doi:10.1111/j.1365-3164.2005.00460.x
- Oliva G, Roura X, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E (2010) Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 236:1192–1198. doi:10.2460/javma.236.11.1192
- Pennisi MG, De Majo M, Masucci M, Britti D, Vitale F, Del Maso R (2005) Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniasis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Vet Rec* 156:346–349
- Sindermann H, Engel J (2006) Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100(Suppl 1):S17–S20. doi:10.1016/j.trstmh.2006.02.010
- Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniasta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portús M (2001) Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol* 96:265–276
- Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J (2007) Detection of Leishmania infantum DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol* 147: 315–319. doi:10.1016/j.vetpar.2007.04.013
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G (2009) Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 165:1–18. doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022
- Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G, The LeishVet Group (2011) LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors* 4:86. doi:10.1186/1756-3305-4-86
- van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB (1992) Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites. *Mol Biochem Parasitol* 51:133–142
- Woerly V, Maynard L, Sanquer A, Eun HM (2009) Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniasis. *Parasitol Res* 105:463–469

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad muy compleja desde el punto de vista de la clasificación taxonómica, la epidemiología, el diagnóstico, la inmunopatología y las manifestaciones clínicas, lo que hace que las estrategias de control también lo sean (Pennisi, 2015). En el sur de Europa se ha estimado que al menos 2,5 millones de perros están infectados por *L. infantum* (Moreno y Alvar, 2002; Athanasiou *et al.*, 2012).

A lo largo de este trabajo hemos pretendido comparar la eficacia de las técnicas diagnósticas tradicionales con técnicas moleculares sobre muestras no invasivas, aplicadas a un modelo canino experimental. Mediante la infección experimental en modelo canino, hemos podido conocer con exactitud la cronicidad y evolución del estado clínico, clínicopatológico, inmunológico y parasitológico a lo largo de un año. A su vez, hemos evaluado la eficacia de dos nuevas moléculas en la terapia de la Lcan: una formulación novedosa y mejorada de AmB (FPA) y OIPC, una molécula probada por primera vez en perros con infección natural con resultados prometedores previos en el modelo murino y de fácil administración.

5.1. Valoración del diagnóstico parasitológico en un modelo experimental de infección por *L. infantum*

5.1.1. Modelo experimental canino

Para la elaboración de nuevos fármacos y vacunas es imprescindible la estandarización de un modelo de leishmaniosis canina experimental que sea capaz de inducir enfermedad en todos los animales infectados y de forma semejante a la infección natural.

El perro como modelo experimental de leishmaniosis presenta las ventajas de actuar como reservorio y compartir manifestaciones clínicas

similares con los humanos. Por ello ha sido utilizado en numerosos estudios de eficacia de nuevos fármacos y vacunas.

La inoculación i.v. de parásitos, aunque más artificial, ha demostrado ser la mejor manera de obtener animales infectados con cuadros clínicos patentes, ya que permite la rápida diseminación del parásito a los diferentes órganos (Campino *et al.*, 2000; Moreno y Alvar, 2002; Paranhos-Silva *et al.*, 2003; Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007; Carcelén *et al.*, 2009). Aunque la infección natural se produce mediante la inoculación intradérmica de parásitos, diversos estudios que han utilizado esta vía muestran que los animales infectados no presentan signos clínicos durante más tiempo (Santos-Gomes *et al.*, 2000; Paranhos-Silva *et al.*, 2003; Travi *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2013).

Estudios recientes de infecciones experimentales con promastigotes obtienen, como en nuestro caso, una exitosa infección en todos los animales, con la aparición de signos clínicos al cabo de un periodo variable (Poot *et al.*, 2005; Rosypal *et al.*, 2005a; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007; Carcelén *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2011; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013).

La primera publicación de esta tesis describe el seguimiento postinfección durante un año de 8 perras de raza Beagle infectadas experimentalmente con *L. infantum*, a propósito de un estudio posterior de eficacia terapéutica. Se valoraron mensualmente parámetros clínicos, inmunológicos y parasitológicos con el fin de conocer mejor los mecanismos patológicos de la infección y su correlación, con el principal objetivo de determinar la presencia y la carga parasitaria de *L. infantum* en diferentes muestras obtenidas tanto de manera invasiva (sangre y MO) como no invasiva (orina, conjuntiva, mucosa oral y vulvar), en comparación con otras técnicas diagnósticas a lo largo del curso de la infección.

El aislado de *L. infantum* empleado para infectar experimentalmente los perros de nuestro estudio fue MCRI/ES/06/BCN-721, proporcionada por la Dra. Montserrat Portús (Universidad de Barcelona). Con una inoculación i.v. de 5×10^7 promastigotes de *L. infantum* por ml en perfusión lenta, el 100% de los animales desarrollaron una infección activa (confirmada por la detección del parásito por PCR), comparable a los resultados obtenidos previamente (Poot *et al.*, 2005; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007). En nuestro modelo experimental transcurridos 120 días desde la infección todos los perros presentaban ya los primeros signos clínicos, a diferencia de otros estudios (Poot *et al.*, 2005; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007), en los que el 21% (3/14) y el 33,3% (2/6) de los animales infectados, respectivamente, no presentaron signos clínicos durante un año p.i.

En nuestro estudio el periodo de prepatencia estuvo comprendido entre los dos y cuatro meses p.i. (siendo una linfadenomegalia leve-moderada el primer signo clínico observado), similar a lo que indican otros autores (Poot *et al.*, 2005; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007; Travi *et al.*, 2009; Martínez-Subiela *et al.*, 2011; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013). La linfadenomegalia es el signo más frecuentemente encontrado en los animales enfermos (Slappendel, 1988; Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 2001), y estuvo presente en el 100% de los animales del estudio, afectando a los LN preescapulares, submandibulares y poplíteos.

La valoración de los signos clínicos y las alteraciones clínicopatológicas en este tipo de estudios debe ser lo más objetiva y precisa posible. Empiezan a ser más los estudios que emplean un sistema de puntuación objetiva de los signos clínicos y/o alteraciones laboratoriales, lo que permite obtener una puntuación clínica individualizada y su valoración a lo largo del tiempo (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007; Miró *et al.*, 2009; Miró *et al.*, 2011).

Desde un punto de vista clínico, los perros deberían clasificarse como “enfermos”, cuando presentan signos clínicos y/o alteraciones clinicopatológicas, o como “infectados pero clínicamente sanos”, si no presentan ningún signo clínico ni alteraciones clinicopatológicas mediante análisis rutinarios de laboratorio, según la clasificación propuesta por el grupo LeishVet (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

En el pasado, y todavía en algunos estudios recientes de eficacia de medicamentos (Travi *et al.*, 2001; Vercammen *et al.*, 2002; da Costa-Val *et al.*, 2007; Neto *et al.*, 2010), los veterinarios e investigadores empleaban una clasificación general subjetiva basada en tres categorías de perros: “asintomáticos”, “oligosintomáticos” y “polisintomáticos” (Mancianti *et al.*, 1988). Dicha clasificación posee un valor muy limitado ya que se basa únicamente en el examen físico del animal, no considerando las alteraciones clinicopatológicas, y engloba en el mismo grupo de animales polisintomáticos tanto a perros con 3 signos clínicos leves como a perros con 10 signos graves y generalizados, pasando por alto perros con una alteración orgánica generalizada sin manifestaciones clínicas aparentes (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Además, denominaban “asintomáticos” a perros con posibles alteraciones clinicopatológicas graves, hecho que puede alterar considerablemente el resultado de eficacia de un fármaco o vacuna. Está descrito que muchos perros pueden padecer enfermedades sistémicas como insuficiencia renal sin presentar lesiones cutáneas agudas ni signos clínicos evidentes (Miró, 2013). Asimismo, este inconveniente metodológico puede llevar a conclusiones incorrectas, como que los perros “asintomáticos” son más infectantes para los flebotomos que los enfermos (Dantas-Torres y Otranto, 2014).

Otras limitaciones halladas sobre todo en estudios multicéntricos incluyen: agrupar 2 ó más signos clínicos como uno solo, observaciones

subjetivas del propietario, el estilo de vida del perro (p.e. perros de propietario individual más controlados que los cazadores), historias clínicas cumplimentadas por veterinarios clínicos diferentes, interpretación subjetiva de la presencia o ausencia de signos clínicos, principalmente cuando son leves, la presencia de otras enfermedades concomitantes, la falta de valoración de alteraciones clinicopatológicas y el tiempo transcurrido hasta obtener un diagnóstico (Noli y Saridomichelakis, 2014).

El amplio abanico de respuestas clínicas que se manifiesta en la infección natural por *L. infantum* (Hommel *et al.*, 1995; Baneth *et al.*, 2008) también se reproduce incluso en las infecciones experimentales bajo condiciones controladas (Poot *et al.*, 2005; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007; Travi *et al.*, 2009; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013). Lo mismo sucedió con nuestro modelo experimental, empleando hembras de la misma raza y de edad similar. Mientras que los perros nº 5, 6 y 7 únicamente mostraron signos como linfadenomegalia y esplenomegalia, y algún signo cutáneo muy leve, los cinco perros restantes desarrollaron un cuadro clínico progresivo y muy evidente, con signos generales y cutáneos.

Las lesiones cutáneas son la manifestación clínicas más comunes en la Lcan, pudiendo ser el único signo clínico presente y suelen ser la principal causa por la que el propietario acude a la consulta (Saridomichelakis y Koutinas, 2014). Cinco de los ocho perros infectados experimentalmente en nuestro estudio presentaron lesiones cutáneas típicas caracterizadas por una dermatitis exfoliativa con alopecia y descamación difusas, localizadas inicialmente en la cabeza y extremidades y que posteriormente se fueron generalizando. Esta forma cutánea es la más común, como puede observarse en los estudios realizados por otros autores (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007; Carcelén *et al.*, 2009; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013). La onicogriposis, otra lesión detectada en el 24-90% de

los perros con leishmaniosis, estuvo presente también en los cinco perros con dermatitis exfoliativa, demostrando, por tanto, la asociación existente entre ambas manifestaciones (Koutinas *et al.*, 2010). De hecho, se ha sugerido que esta alteración podría representar el equivalente a la dermatitis exfoliativa en la piel sin pelo (Saridomichelakis, 2009). En infecciones experimentales la onicogriposis se ha descrito entre el 31 y el 78,6% de los perros (Travi *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2013). También se apreció hiperqueratosis nasal y/o plantar (n=5). A pesar de considerarse una lesión atípica (Ordeix i Esteve y Fondati, 2013; Koutinas y Koutinas, 2014), y haberse descrito un menor número de perros con hiperqueratosis nasal (11/40) y plantar (7/40) (Koutinas *et al.*, 2001; 2010) observaron hiperqueratosis nasal y/o plantar en un 67,6% (25/37) de los casos, siendo estos resultados similares a los de nuestro estudio. Las lesiones cutáneas mencionadas en los perros del estudio no estuvieron asociadas a prurito, como es habitual en la Lcan (Ferrer *et al.*, 1988; Ordeix i Esteve y Fondati, 2013).

La conjuntivitis, un hallazgo frecuente en perros con leishmaniosis, descrita en un 31,4-75,6% de los casos publicados (Slappendel, 1988; Peña *et al.*, 2000; Koutinas *et al.*, 2001) también se observó en cinco perros de nuestro estudio un año p.i. En cambio, en otras infecciones experimentales la conjuntivitis fue menos frecuente, detectándose en tres de 25 beagles a los 12 meses p.i. (Fernández-Cotrino *et al.*, 2013) y en uno de seis perros a los 7 meses p.i. (Strauss-Ayali *et al.*, 2007; Martínez-Subiela *et al.*, 2011).

Otra alteración sistémica importante de la Lcan es la atrofia muscular, presente en tres perros de nuestro estudio, principalmente de los músculos temporales. Koutinas *et al.* (1999) encontraron atrofia de los músculos maseteros en un porcentaje similar (24,1%), sin embargo en otro

grupo de perros con Lcan obtuvieron un resultado muy superior, 84,4% (Koutinas *et al.*, 2001).

Las puntuaciones clínicas obtenidas a partir del sumatorio de los signos clínicos aumentaron progresivamente a lo largo del tiempo (**Fig. 15**), llegando a ser más elevadas en los animales 2 y 3, que además presentaban lesiones cutáneas.

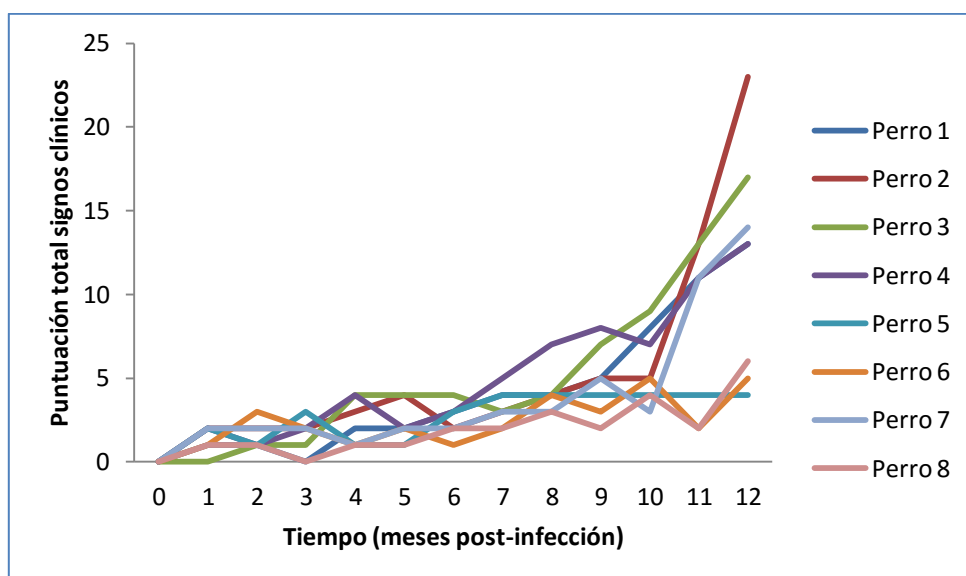


Figura 15. Evolución de la puntuación clínica a lo largo de un año tras la infección experimental por *L. infantum*. (Puntuación máxima posible: 52).

Los análisis sanguíneos y urinarios demostraron alteraciones clínicopatológicas comunes en perros con Lcan natural y experimental, tales como anemia no regenerativa, trombocitopenia, hiperproteinemia debida a gammaglobulinemia y a una inversión del cociente A/G (**Fig. 16**), y proteinuria (Alvar *et al.*, 2004; Saridomichelakis, 2009; Maia *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Fernández-Cotrino *et al.*, 2013). La anemia no regenerativa es la alteración hemática más frecuente en la Lcan (Saridomichelakis, 2009) y estuvo presente en seis de los ocho animales de

nuestro estudio, lo que indica la importante implicación de la MO, tejido muy parasitado en individuos enfermos.

La hiperproteinemia causada por una hipergammaglobulinemia, estuvo presente en todos los perros al final del año p.i., de manera similar a lo observado por otros autores, que describen un incremento de las proteínas totales debido a una mayor producción de anticuerpos (Koutinas *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta que a lo largo del estudio, todos los perros fueron alimentados con una dieta equilibrada, sin una reducción en la ingesta diaria de proteínas y calorías, la causa más probable de hipoalbuminemia es una pérdida renal de albúmina.

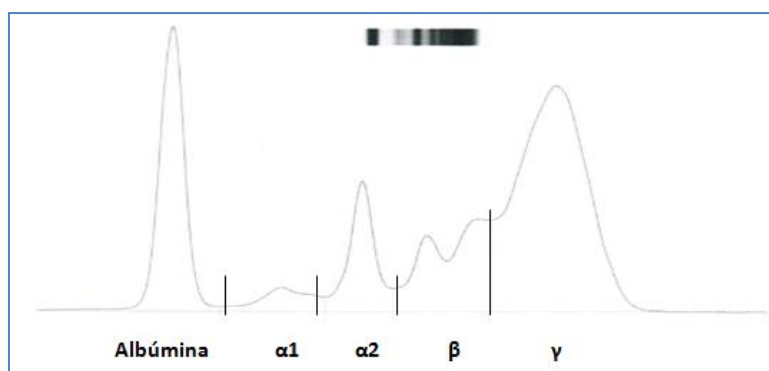


Figura 16. Electroforesis de proteínas séricas que muestra un proteinograma alterado del perro nº 4 (D240 p.i.). Hipoalbuminemia (1,82 g/dl), hipergammaglobulinemia (4,92 g/dl) e inversión de la ratio A/G (0,25).

En infecciones naturales, los intervalos de seroconversión oscilan entre 1 y 22 meses (5 meses de media) en perros con infección natural por *L. infantum* (Moreno y Alvar, 2002; Oliva *et al.*, 2006). Por tanto, el diagnóstico serológico puede ser poco sensible en las primeras fases de la infección, pudiendo infradiagnosticar alrededor del 30% de las infecciones recientes (Courtenay *et al.*, 2002). Sólo en los perros en los que el parásito se haya diseminado, los títulos de anticuerpos aumentan en el tiempo, por lo que el valor predictivo de la serología por sí misma es limitado (Martínez *et al.*,

2011). Por ello, la utilidad de los métodos serológicos para la monitorización de los perros tratados es muy controvertida.

En nuestro estudio, a lo largo del curso de la infección se apreció un aumento temprano y progresivo de la respuesta inmunitaria humoral en todos los animales, produciéndose la seroconversión entre los 4 y los 6 meses p.i., similar a lo obtenido en otras infecciones experimentales (Campino *et al.*, 2000; Paranhos-Silva *et al.*, 2003; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013). Cuando la respuesta inmunitaria está mediada por LTh2, la producción de anticuerpos desencadenada por la IL-4 es elevada, lo que está asociado con manifestaciones clínicas graves debido al depósito de IC en órganos y tejidos (Baneth *et al.*, 2008; de Freitas *et al.*, 2012; Proverbio *et al.*, 2014).

La técnica de IFI fue la elegida para su valoración, considerada como la técnica serológica de referencia debido a su elevada sensibilidad y especificidad (Alvar *et al.*, 2004; Maia y Campino, 2008) debido a su elevada sensibilidad y especificidad (Mancianti *et al.*, 1995; Ciaramella *et al.*, 1997). Diferentes resultados obtenidos mediante esta técnica en otros estudios mostraron una seroconversión muy temprana a los 30-45 d.p.i. (Martínez-Moreno *et al.*, 1995; Carrera *et al.*, 1996; Leandro *et al.*, 2001; Maia *et al.*, 2010), o a partir de los 3 meses p.i. (Campino *et al.*, 2000; Rosypal *et al.*, 2005a; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013).

Los niveles de anticuerpos de los perros de nuestro estudio alcanzaron títulos muy elevados (rango: 1/3200-1/12800), superiores a lo observado en otras infecciones experimentales. Cabe destacar la gran importancia que cobra establecer un consenso global sobre el punto de corte de las técnicas serológicas, con el fin de poder extrapolar de una forma precisa y global los resultados obtenidos en diferentes estudios que empleen

la misma técnica. En consecuencia, las titulaciones más bajas halladas en otras infecciones experimentales podrían deberse a que no titularon por encima de 1/400 (Rosypal *et al.*, 2005a) o 1/640 (Carcelén *et al.*, 2009; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013).

A pesar de que no hallamos una asociación significativa entre el cuadro clínico y el nivel de anticuerpos en nuestro estudio, los dos perros con mayor puntuación clínica presentaron títulos más elevados (1/12800). Asimismo, en el estudio llevado a cabo por Proverbio *et al.* (2014), el perro con mayor puntuación clínica (30, de un máximo de 87) también fue el que presentó el título de anticuerpos más elevado (1:10240).

Mediante las técnicas de visualización directa (citología y cultivo de aspirados de MO) se detectó la presencia de *Leishmania* entre el tercer y el quinto mes p.i. en todos los animales. No obstante, la observación microscópica de citologías de MO permitió detectar amastigotes de *L. infantum* dos meses antes que mediante el cultivo específico. A partir del sexto mes p.i., todos los perros resultaron positivos mediante cultivo, aportando esta técnica unos resultados más estables que la citología de MO, con la cual algunos perros resultaban negativos de forma transitoria, debido a la baja carga parasitaria detectable en algunas muestras, que supone una difícil interpretación (Moreira *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2011). La mayoría de los cultivos NNN fueron positivos en la primera semana, y menos frecuentemente en la segunda o tercera semana, como describen Maia *et al.* (2009).

De acuerdo con Ferrer (1999) y Alvar *et al.* (2004), la sensibilidad de la microscopía de citologías de MO es mayor (60-75%) a la de LN (30-50%), viéndose ésta incrementada cuando se trata de perros infectados experimentalmente (Maia y Campino, 2008). No obstante se ha demostrado

que los perros enfermos pueden presentar sensibilidades de 88,2% en MO y de 94,7% en LN (Saridomichelakis *et al.*, 2005).

Tabla IX. Clasificación de los perros incluidos en el estudio mediante el sistema de estadios clínicos de la Lcan de las guías del Grupo de Expertos Europeos en Leishmaniosis canina (LeishVet) (Solano-Gallego *et al.*, 2011)

Perro	Serología (IFI)	Signos clínicos	Hallazgos laboratoriales	Estadio clínico
1	1/12800	Linfadenomegalia, lesiones cutáneas difusas	Anemia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, UPC=0,5-1	IIb
2	1/12800	Linfadenomegalia, astenia, atrofia muscular, lesiones cutáneas	Anemia, trombocitopenia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia	IIa
3	1/12800	Linfadenomegalia, astenia, atrofia muscular, conjuntivitis, lesiones cutáneas	Hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, UPC=0,5-1	IIb
4	1/12800	Linfadenomegalia, astenia, atrofia muscular, conjuntivitis, lesiones cutáneas	Anemia, leucocitosis, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia.	IIa
5	1/6400	Linfadenomegalia, lesiones cutáneas	Hiperglobulinemia, hipoalbuminemia	IIa
6	1/3200	Linfadenomegalia, lesiones cutáneas	Trombocitopenia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia	IIa
7	1/6400	Linfadenomegalia, atrofia muscular, conjuntivitis, lesiones cutáneas	Anemia, trombocitopenia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia	IIa
8	1/3200	Linfadenomegalia, conjuntivitis, lesiones cutáneas	Anemia, trombocitopenia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia	IIa

5.1.2. Técnicas moleculares

Diversos estudios han demostrado que las técnicas moleculares no sólo permiten una detección más precisa de *Leishmania* y emplear muestras no invasivas (Cruz *et al.*, 2013), sino que también revelan antes la presencia del ADN del parásito, incluso antes de que se produzca la seroconversión y aparezcan los signos clínicos (Oliva *et al.*, 2006; Coura-Vital *et al.*, 2011). En infecciones experimentales la seroconversión suele ocurrir entre 1 y 6 meses (intervalo: 4-22 meses) (Moreno y Alvar, 2002), mientras que en infecciones naturales, la media se estima en 10,5 meses (Oliva *et al.*, 2006). Este hecho pone de manifiesto la importancia de una detección temprana de la infección por técnicas moleculares, especialmente la qPCR, siendo capaz de cuantificar niveles extremadamente bajos de parásitos en los tejidos de los animales infectados (Francino *et al.*, 2006; Manna *et al.*, 2008b). Esta técnica es especialmente útil en el diagnóstico y la valoración de la eficacia terapéutica (Mary *et al.*, 2004; Pennisi *et al.*, 2005b; Martínez *et al.*, 2011; da Silva *et al.*, 2012).

La qPCR permite detectar y cuantificar la carga parasitaria en los tejidos de los perros infectados, hecho muy importante tanto para el diagnóstico como para el seguimiento durante el tratamiento de Lcan (Manna *et al.*, 2008d; Martínez *et al.*, 2011; da Silva *et al.*, 2012). No obstante, la interpretación de sus resultados puede ser complicada debido a la inconsistencia de los mismos, pudiendo mostrar perros muy enfermos cargas parasitarias bajas y viceversa (Bourdeau *et al.*, 2014). Por ello, la información obtenida por PCR debe analizarse junto con los resultados proporcionados por las pruebas clinicopatológicas y serológicas, con el fin de realizar una valoración completa (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Cargas parasitarias inferiores a 1 parásito/ml pueden deberse bien a un bajo rendimiento en la extracción cuando la carga parasitaria es muy baja, o a la detección de ADN residual del parásito que persiste por un tiempo en el interior de los macrófagos tras la destrucción del parásito (Mary *et al.*, 2004).

Con el objetivo de maximizar su sensibilidad, en la primera y segunda publicación se utilizó como diana molecular el ADN microcircular del kinetoplasto (kADN) y la sonda TaqMan, técnica previamente descrita por (Francino *et al.*, 2006). El kADN ha demostrado ser más sensible que el ADN genómico para el diagnóstico de la Lcan (Lachaud *et al.*, 2002b; Miró *et al.*, 2008, Cruz *et al.*, 2013), debido al elevado número de copias de ADN (alrededor de 10000 copias por parásito) presentes en el kADN (Rodgers *et al.*, 1990). El resultado es una qPCR que nos permite discriminar desde 0,01 hasta 10000 leishmanias en una única reacción de PCR.

5.1.2.1. Valoración de las muestras invasivas

Debido a la gran variabilidad que presenta *Leishmania* en el tropismo por los diferentes tejidos, o bien a la inmunidad específica de cada órgano, la cantidad de parásitos varía entre unos y otros, dando lugar a una compartimentalización de la infección, por lo que es importante elegir la muestra que proporcione mayor información (Solano-Gallego *et al.*, 2001b; Reithinger *et al.*, 2002a; Sanchez *et al.*, 2004). Diversos estudios han mostrado mayor carga parasitaria en MO y LN poplíteo en comparación con sangre periférica o *buffy coat* (Francino *et al.*, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2008a; Manna *et al.*, 2009a; Quaresma *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2011) de manera que cargas parasitarias mayores de 100-1000 parásitos/ml en MO son detectables en sangre, mientras que cargas parasitarias inferiores (1-100 parásitos/ml en MO) son normalmente

negativas en sangre (Martínez *et al.*, 2011). No obstante, Ramos *et al.* (2013) no encuentran diferencias estadísticamente significativas entre las cargas parasitarias de MO, LN y bazo. Diversos estudios muestran una asociación positiva entre la carga parasitaria y los signos clínicos (Manna *et al.*, 2009a; Ramos *et al.*, 2013). Según Martínez *et al.* (2011), los perros con parasitemias medias-altas o muy altas están enfermos o lo estarán. A su vez, Courtenay *et al.* (2014) demostraron que sólo perros con elevadas cargas parasitarias fueron infectantes de manera consistente para los flebotomos, y sostienen que la mayor parte de las infecciones de flebotomos se pueden atribuir a una pequeña proporción de perros infectantes (Molina *et al.*, 1994; Courtenay *et al.*, 2002).

En perros infectados pero clínicamente sanos se ha demostrado mediante qPCR una elevada carga parasitaria en piel, lo que resalta el papel que juegan estos perros como reservorios de Lcan. Este hecho podría explicar las elevadas tasas de transmisión en regiones urbanas endémicas, ya que los flebotomos se infectan a través de picaduras en la piel (Leite *et al.*, 2010; de Almeida Ferreira *et al.*, 2012).

En el estudio llevado a cabo por Martínez *et al.* (2011) el valor predictivo positivo de la qPCR fue mayor que el de la serología por ELISA (67,8% frente a un 50%), es decir, la mayoría de los perros que resultaron positivos mediante qPCR se clasificaron como enfermos de Lcan.

En nuestro estudio experimental (publicación 4.1.) la carga parasitaria varió mucho entre los animales y entre los diferentes tejidos analizados. La MO resultó ser el órgano con mayor concentración de parásitos y el que permitió un diagnóstico de la infección más temprano que la sangre mediante qPCR, de manera que seis perros ya fueron positivos el D90, y los dos perros restantes (nº 5 y 8) lo fueron un mes después, siendo

además estos perros los que presentaron las cargas más bajas el D120 (18,9 y 90,7 parásitos/ml, respectivamente). El D90, tan sólo los perros nº 2 y 7 resultaron positivos en sangre. Estos resultados muestran una detección más temprana, tanto en MO como en sangre, en relación con el estudio llevado a cabo por Maia *et al.* (2010), en el que el D90 ningún perro fue positivo en sangre mediante qPCR y tan sólo dos lo fueron en MO.

En MO se observó una elevación en la carga parasitaria el día 270 p.i. en los perros nº 1 (4.800.000 parásitos/ml), 4 (139.500 parásitos/ml), 5 (9.870 parásitos/ml) y 8 (580 parásitos/ml), mientras que en sangre se observó esta elevación el día 360 p.i. Cabe destacar que en el perro nº 8 no se detectó ADN de *L. infantum* en sangre en ningún momento a lo largo del año de seguimiento, mientras que en MO sí resultó positivo, aunque con una baja carga, en comparación con el resto de los animales infectados. Este hecho podría deberse a que la MO, donde se produce la invasión y multiplicación de los parásitos, actúa como un órgano diana, mientras que la sangre actuaría como un medio de transporte, en lugar de un órgano de reserva (Quaresma *et al.*, 2009) y, por tanto, se obtendrán resultados positivos en sangre durante la infección de forma no consistente (Strauss-Ayali *et al.*, 2004). Además, la sangre puede contener una serie de inhibidores de la PCR que pueden afectar a la sensibilidad de esta técnica (Fisa *et al.*, 2001; Lachaud *et al.*, 2002a; Reithinger *et al.*, 2002b). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios, en los que se obtiene mayor sensibilidad en MO que en sangre periférica (Francino *et al.*, 2006; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007; Quaresma *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2011).

Sin embargo, en la infección experimental de similares condiciones llevada a cabo por Rodríguez-Cortés *et al.* (2007) en seis perros, cinco animales resultaron positivos en sangre mediante PCR a los 4 meses p.i. y el

animal restante 3 meses después, siendo la media de la parasitemia a lo largo del año de seguimiento de 463 parásitos/ml (rango: 7-12800). Observaron una primera elevación de parasitemia a los 6 meses p.i. y una segunda elevación menor a los 10-11 meses p.i. en 3 animales. En MO hubo 2 animales que siempre fueron negativos mediante PCR, aunque los otros 4 mostraron una carga parasitaria entre 100 y 5000 veces superior a la encontrada en sangre (4135690 parásitos/ml a los 6 meses p.i. en un animal).

5.1.2.2. Valoración de las muestras no invasivas

Si bien varios estudios muestran que se obtienen mejores resultados en las muestras de MO, LN y piel, tanto en perros enfermos como en aquellos con infección subclínica (Mimori *et al.*, 2002; Manna *et al.*, 2004; Maia y Campino, 2008; Miró *et al.*, 2008; Quaresma *et al.*, 2009), no existe aún un acuerdo sobre cuál debería ser la muestra estándar (Manna *et al.*, 2004; Lombardo *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013).

Aunque previamente ya se había demostrado la presencia de ADN de *L. infantum* en la orina de perros con infección natural (Franceschi *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2008a), en nuestro estudio se cuantifica por primera vez la carga parasitaria en perros infectados experimentalmente a lo largo de un año.

En nuestro estudio a los cuatro meses p.i. ningún animal resultó positivo a la PCR, y un año p.i. encontramos en seis animales una baja carga de ADN (media: 1,46 promastigotes/ml), siendo mucho menor a la cuantificada por Solano-Gallego *et al.* (2007) y Manna *et al.* (2008a), en cuyos estudios contaban con un 17 y un 30% de perros con una marcada insuficiencia renal. En el nuestro, ningún animal mostró alteraciones clínicopatológicas compatibles con insuficiencia renal, ni ratio UPC>1. Por tanto, nuestros resultados confirman que la orina no sería la muestra de

elección para diagnosticar Lcan, especialmente en perros sin afección renal. Al igual que en los estudios anteriormente citados (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2008a), observamos una menor sensibilidad de la orina respecto a la MO y sangre.

Los amastigotes localizados en el interior de macrófagos pueden alcanzar la mucosa mediante ruta linfática y/o hemática (Reithinger *et al.*, 2002a). Teniendo en cuenta que en la mucosa tiene lugar una gran proliferación celular y constantemente se generan células exfoliativas, la colección de estos tejidos mediante hisopos de manera no invasiva supone una fuente de material biológico donde buscar y cuantificar *L. infantum*. En nuestro estudio encontramos una mayor carga parasitaria en la mucosa vulvar, seguida de la oral y conjuntival.

La utilidad del hisopo de mucosa oral en el diagnóstico de la Lcan en infecciones naturales mediante cPCR y qPCR se ha estudiado recientemente en varios trabajos, obteniendo resultados variables. En Europa, la sensibilidad obtenida mediante qPCR sobre HO es baja. En el estudio llevado a cabo por Lombardo *et al.* (2012) en Italia con perros seropositivos, tan sólo el 8,7% resultaron positivos en los HO, y dos años más tarde estos mismos autores obtuvieron únicamente un HO positivo de ocho analizados en perros con dermatitis papular de Italia por *L. infantum* (Lombardo *et al.*, 2014). De manera similar, Solano-Gallego *et al.* (2013) detectaron a partir de HO un 15% de perros con leishmaniosis clínica en Chipre, y un 0% en perros clínicamente sanos. Por el contrario, Ferreira *et al.* (2013) demostraron en Brasil un elevado potencial diagnóstico del HO, resultando el 79% de los perros positivos mediante cPCR, equivalente a la MO. Además, en este último estudio obtuvieron una mayor sensibilidad al combinar diferentes muestras obtenidas mediante hisopo (HO + hisopo nasal: 93%; HO + HC: 86%). Las diferencias encontradas entre estos estudios de Europa y Brasil

podrían explicarse por la existencia de especies diferentes de *Leishmania* entre Europa (*L. infantum*) y Brasil (*L. braziliensis*) y por la inclusión de perros enfermos con lesiones en la mucosa oral (úlceras, nódulos e hiperpigmentación) del estudio realizado en Brasil (Ferreira *et al.*, 2013).

A día de hoy no hemos encontrado ninguna publicación describiendo la utilidad de los HO en la Lcan experimental. Seis de los ocho perros de nuestro estudio ya fueron positivos el día 120 p.i., mostrando una mayor sensibilidad que la obtenida con sangre, orina y mucosa conjuntival, y un año p.i. todos resultaron positivos, observándose además un aumento de la carga parasitaria, alcanzando los 1060 parásitos/ml en el perro nº 4. Esta carga fue superior a la obtenida por Lobardo *et al.* (2012), que describen una media de 7 parásitos/ml (intervalo: 2-200), siendo igual a la carga media en sangre para dicho estudio. En cambio, en nuestro estudio, la sangre presentó una carga muy superior a la del HO. La presencia de ADN de *Leishmania* en los HO descrita sugiere que amastigotes potencialmente viables podrían ser transmitidos a otros hospedadores susceptibles mediante la mordedura o el lamido de perros infectados. No obstante, esta vía de transmisión no ha sido probada (Solano-Gallego *et al.*, 2011) y son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis.

Por otra parte, en nuestro estudio se demuestra, por primera vez, la presencia de ADN de *Leishmania* en hisopos de mucosa vulvar en perros. Previamente ya se había descrito mediante cortes histológicos la presencia de amastigotes de *Leishmania* en el interior de macrófagos en la vulva de hembras con Lcan (Silva *et al.*, 2008). Como ya se mencionado anteriormente, han sido confirmados otros mecanismos de transmisión de la Lcan en ausencia del vector: a través de donaciones de sangre (Owens *et al.*, 2001; de Freitas *et al.*, 2006), placenta (transmisión vertical) (Rosypal *et al.*, 2005b; da Silva *et al.*, 2009) y sexual (transmisión venérea) (Silva *et al.*,

2009). A lo largo del año p.i. ningún animal presentó lesiones en la mucosa vulvar, aunque sí encontramos en este tejido una carga parasitaria superior a la de la conjuntiva, mucosa oral y orina, con una elevada sensibilidad, resultando todos los animales menos el animal nº 8 positivos el día 120 p.i. Este hecho pone de manifiesto la importancia que pueden jugar las hembras infectadas en la transmisión venérea, así como la utilidad de este tejido en el diagnóstico de la Lcan.

Hasta el momento, la muestra no invasiva con mejores resultados de sensibilidad (92%) y especificidad (100%) en el diagnóstico de la Lcan parece ser el HC, incluso en perros infectados clínicamente sanos (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Pilatti *et al.*, 2009; Leite *et al.*, 2010). Se han observado cargas parasitarias similares en el aspirado de MO (de Almeida Ferreira *et al.*, 2012; 2013) con una sensibilidad comparable a la del LN (Lombardo *et al.*, 2012).

En un estudio reciente, el 44,4% (4/9) de los perros con dermatitis papular por *L. infantum* resultaron positivos mediante qPCR de HC (Lombardo *et al.*, 2014), mientras que tan sólo el 5,8% (1/17) resultó positivo en LN y ninguno en sangre. Esto sugiere que la infección en algunos perros puede no estar limitada al lugar de inoculación, incluso en perros con formas cutáneas de infección localizada como la papular, pudiendo, por tanto, detectarse la infección en otras localizaciones.

De acuerdo con nuestro estudio, se obtuvo una elevada sensibilidad el día 360 p.i. resultando todos los animales positivos, aunque con una carga más baja respecto a los hisopos de mucosa oral y vulvar. La baja carga parasitaria en conjuntiva también ha sido descrita previamente (Lombardo *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013), siendo probable que los amastigotes alcancen el epitelio conjuntival y permanezcan allí a través de un bajo número de macrófagos infiltrados (Strauss-Ayali *et al.*, 2004). Varios autores han

descrito que con el análisis conjunto de ambos ojos se obtiene una mayor frecuencia de resultados positivos que utilizando sólo uno (Ferreira *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2008; Pilatti *et al.*, 2009; Lombardo *et al.*, 2012), aunque no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambos ojos por separado. Por tanto, el empleo de un solo hisopo conjuntival es suficiente, como se ha confirmado en nuestro estudio, para detectar y cuantificar la presencia de *L. infantum*, y podría considerarse útil en el diagnóstico a gran escala de Lcan en poblaciones de perros mediante PCR (de Almeida Ferreira *et al.*, 2012).

La presencia de ADN de *Leishmania* en la mucosa conjuntival se detectó más tarde que en el resto de tejidos analizados, siendo seis animales negativos a los cuatro meses p.i. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gramiccia *et al.* (2010) en un estudio longitudinal para detectar la infección por *Leishmania* en perros de una zona endémica y en el cual la nPCR de HC resultó no ser eficaz para la detección precoz de la infección. Sin embargo, sí observaron que tras unos meses un elevado número de perros se volvieron positivos mediante esta técnica, incluso sin presentar seroconversión. Por el contrario, en el estudio llevado a cabo por Strauss-Ayali *et al.* (2004) en seis perros de raza Beagle infectados experimentalmente con *L. infantum*, cinco perros resultaron positivos por cPCR en hisopo de al menos una conjuntiva a los 45 días p.i., previamente a la seroconversión, y el día 75 p.i. los seis perros fueron positivos en, al menos, una conjuntiva. Estas diferencias podrían deberse a varias causas: 1) la infección experimental se llevó a cabo inoculando amastigotes por vía i.v., 2) realizaron la extracción de ADN con fenol-cloroformo, técnica que en algunos estudios ha mostrado tener mayor eficacia que otros métodos (Ferreira *et al.*, 2008) o 3) porque valoraron hisopos de ambas conjuntivas en lugar de sólo una.

Cada vez son más numerosos los estudios que detectan la presencia de ADN de *L. infantum* en muestras obtenidas mediante procedimientos no invasivos, y más recientemente cuantifican la carga parasitaria en dichas muestras. Mientras que la gran mayoría se centran en infecciones naturales, nuestro estudio se basó en animales infectados experimentalmente, lo que nos ha permitido seguir la evolución de la carga parasitaria en los tejidos analizados, desde el principio de la infección y a lo largo de un año completo. Además, hemos demostrado la elevada carga de *L. infantum* en la mucosa vulvar de animales infectados experimentalmente, lo que pone de manifiesto la importancia de realizar futuros estudios en perros con infección natural.

5.1. Alternativas terapéuticas en la leishmaniosis canina

Hasta el momento, ninguno de los tratamientos empleados frente a la Lcan induce una curación parasitológica permanente, ya que en la mayoría de los casos parte de los parásitos permanecen en los órganos hematopoyéticos pudiendo reactivarse una infección clínica (Baneth y Shaw, 2002; Martínez *et al.*, 2011), incluso cuando los perros tratados presentan una buena respuesta clínica inicial pueden sucederse las recidivas (Moreira *et al.*, 2007). Algunos autores opinan que es muy difícil que perros que viven en zonas endémicas de Lcan logren una curación parasitológica tras el tratamiento, debido a las frecuentes reinfecciones (Moreno y Alvar, 2002; Baneth y Aroch, 2008; Miró *et al.*, 2008).

La comparación de los diversos estudios de eficacia terapéutica que existen en la literatura es una tarea muy compleja, por la falta de similitud entre los métodos empleados (Oliva *et al.*, 2010). Otros inconvenientes hallados en el análisis de los diferentes estudios son:

- 1) Carencia de estudios ciegos y grupos control

- 2) Número reducido de perros incluidos en los estudios
- 3) La diversidad de formas clínicas de los perros antes de iniciar el tratamiento
- 4) La falta de estandarización de los métodos diagnósticos, no existiendo aún un consenso para evaluar la eficacia clínica y parasitológica
- 5) Periodos de seguimiento post-tratamiento insuficientes, siendo muy pocos los estudios que superan el año de duración
- 6) Gran diversidad de posologías y principios activos

La tendencia actual a la hora de valorar la eficacia clínica de un tratamiento es hacer una valoración objetiva y fiable de la situación clínica de los pacientes mediante una puntuación clínica (Miró *et al.*, 2009; Athanasiou *et al.*, 2013; Manna *et al.*, 2015). En cuanto a la eficacia parasitológica, la gran mayoría de los autores utilizan la detección y/o cuantificación de la carga parasitaria de *Leishmania* en órganos diana, como la MO, LN y bazo, mediante qPCR (Francino *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2012; Manna *et al.*, 2015).

Resulta muy difícil comparar la eficacia terapéutica de los distintos estudios cuando ésta se basa en el aclaramiento parasitológico, debido a la variación de los métodos diagnósticos (cultivo en medio específico, citología, CPCR, qPCR...), el tipo de muestra (aspirado de MO, de bazo, LN, sangre...) y el momento de recogida de dichas muestras.

Otro hecho a tener en cuenta a la hora de valorar la eficacia del tratamiento es que influyen muchos otros factores, como la respuesta individual del paciente, la virulencia del aislado o la existencia de enfermedades concomitantes (enfermedades infecciosas, neoplasias, enfermedades autoinmunes, endocrinopatías, etc) (Miró, 2006). Diversos

estudios han demostrado que la coinfección de *Leishmania* con otros patógenos es frecuente, especialmente las enfermedades vectoriales bacterianas o parasitarias, como las transmitidas por garrapatas: babesiosis, hepatozoonosis, ehrlichiosis (Mekuzas *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2014); dirofilariosis (De Tommasi *et al.*, 2013), pero también las dermatosis parasitarias, como la sarna sarcóptica y la demodicosis (Mozos *et al.*, 1999). Estas infecciones concomitantes pueden alterar sensiblemente los resultados obtenidos, haciendo que la respuesta al tratamiento no sea la esperada.

5.2.1. Eficacia terapéutica de la anfotericina B poliagregada (FPA)

La mayoría de los principios activos frente a la Lcan producen una mejoría clínica tras el tratamiento e incluso, en algunos casos, una remisión completa de los signos clínicos (Ikeda-García *et al.*, 2007; Pasa *et al.*, 2005; Rougier *et al.*, 2012; Manna *et al.*, 2015).

El uso de AmB para el tratamiento de la leishmaniosis en el perro conlleva algunos inconvenientes: constituye la primera línea de tratamiento en su forma liposomal para la LV humana en varios países, su vía de administración i.v., su elevado coste y los efectos adversos asociados. Sin embargo, el estudio de la AmB en esta Tesis doctoral se justifica por su baja tasa de resistencias descrita en la literatura (Shakya *et al.*, 2011), la elevada eficacia observada previamente y, sobre todo, por el empleo de una novedosa formulación poliagregada con menos efectos adversos y bajo coste (Brunete *et al.*, 2004; Espada *et al.*, 2008a; 2008b; Sánchez- Serrano *et al.*, 2013), y su posible futura aplicación en el tratamiento de la LV humana.

5.2.1.1. Valoración de los animales antes del tratamiento

Al inicio del tratamiento con FPA (publicación 4.2.), los ocho perros se encontraban clasificados dentro del estadio II de las guías de Leishvet. La puntuación clínica obtenida mediante un sistema categorizado de signos clínicos fue el día de comienzo del tratamiento de $16,5 \pm 7,6$ (media \pm DE), hasta un máximo posible de 52 puntos.

5.2.1.2. Eficacia clínica

Todos los signos clínicos observados durante el examen físico llevado a cabo mensualmente fueron anotados en el formulario de seguimiento clínico, y se calculó con ellos el porcentaje de reducción de las puntuaciones clínicas a lo largo del tiempo (**Tabla X**).

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con FPA no consiguió reducir las puntuaciones clínicas en la mayoría de los perros tratados, sino que, al contrario, la mitad de ellos experimentó un empeoramiento de la condición clínica, especialmente de la piel, al final del periodo de seguimiento. Estos resultados son muy diferentes a los obtenidos en ensayos previos con emulsiones lipídicas de AmB, en los que consiguieron una curación clínica de todos los perros al cabo de varios meses (Moreno *et al.*, 1999; Lamothe, 2001; Cortadellas, 2003). No obstante, tanto por la formulación de la molécula empleada como por la metodología, estos estudios no son fácilmente comparables.

Tabla X. Porcentajes de reducción en la puntuación clínica a lo largo del tiempo (T1-PT6).

Perro	PR PT1-T1	PR PT2-T1	PR PT3-T1	PR PT4-T1	PR PT5-T1	PR PT6-T1
1	33,33	38,89	5,56	-11,11	-27,78	SD
2	3,70	-3,70	14,81	22,22	22,22	22,22
3	0,00	-26,09	-39,13	-47,83	-30,43	-13,04
4	-22,22	-11,11	0,00	5,56	16,67	5,56
5	0,00	0,00	83,33	-50,00	-133,33	-116,67
6	-9,09	-27,27	72,73	9,09	-9,09	0,00
7	0,00	13,04	21,74	30,43	69,57	65,22
8	38,46	61,54	61,54	69,23	69,23	61,54
Media	5,52	5,66	27,57	3,45	-2,87	3,55
DE	20,48	31,11	41,74	39,90	65,35	60,91
Máx	38,46	61,54	83,33	69,23	69,57	65,22
Mín	-22,22	-27,27	-39,13	-50,00	-133,33	-116,67

PR: Porcentaje de reducción; SD: Sin determinar, debido al fallecimiento del perro nº 1; DE: Desviación estándar; Máx: Valor máximo (se corresponde con el perro con mayor puntuación clínica); Mín: Valor mínimo (se corresponde con el perro con menor puntuación clínica). Los valores en verde indican una evolución favorable entre el final del periodo de seguimiento y el comienzo del tratamiento. Los valores en rojo indican una evolución desfavorable.

En el intervalo de dos semanas existente entre la primera y segunda dosis de tratamiento (T1 y T2) se produjo un ligero incremento de la puntuación clínica en siete animales, correspondiente a la aparición de cansancio y astenia en el perro nº 2, polidipsia en el nº 7, y a la pérdida de peso ligera en seis animales. Este incremento fue más notable en el perro nº 8, en el cual se pudo observar astenia, cansancio, polidipsia, pérdida de apetito y de peso en los 14 días posteriores al tratamiento. En el resto de perros no hubo ninguna mejoría clínica, por el contrario, en los perros nº 1, 3

y 5 se observa un aumento progresivo de la puntuación clínica total hasta el final del estudio.

Cabe destacar la evolución favorable ocurrida en el perro nº 8, en el cual tras las reacciones adversas sufridas durante la segunda administración de FPA, disminuyeron los signos clínicos, con una drástica reducción a partir del día PT1, de manera que al final del estudio los únicos signos presentes fueron linfadenomegalia y esplenomegalia. Igualmente, el animal nº 7 desarrolló una respuesta clínica muy favorable a partir del quinto mes post-tratamiento, desapareciendo la atrofia muscular y disminuyendo las lesiones cutáneas. Ambos perros alcanzaron una reducción de la puntuación clínica del 69,6 y 69,2%, respectivamente, al final del estudio.

Como ya se ha descrito previamente por Lamothe (2001), la toxicidad asociada a la AmB puede provocar la muerte de los perros con cuadros más graves de leishmaniosis, al igual que ocurrió con el perro nº 1 de nuestro estudio.

Al contrario de lo observado por otros autores (Oliva *et al.*, 1995; Bekersky *et al.*, 1999; Cortadellas, 2003; Lamothe, 2001), en nuestro trabajo los valores de urea y creatinina séricos permanecieron estables a lo largo de todo el estudio. Sin embargo, cinco animales de ocho desarrollaron proteinuria (como demostró el aumento de UPC en el urianálisis) tras el tratamiento. Dicha proteinuria podría estar causada por el daño glomerular producido por el depósito de IC por la propia leishmaniosis, o bien ser causa del efecto nefrotóxico de la AmB, principalmente por vasoconstricción y reducción de la tasa de filtración glomerular (Cortadellas, 2003; Laniado-Laborín y Cabrales-Vargas, 2009). Por tanto, es imprescindible monitorizar la función renal antes, durante y después del tratamiento con AmB, ya que la proteinuria es un importante factor de riesgo para el desarrollo y progresión

de enfermedad renal, siendo ésta la complicación más grave de la Lcan, y por tanto, asociada a un peor pronóstico en la Lcan (Jacob *et al.*, 2005; Pierantozzi *et al.*, 2013). De hecho, animales en estadio I y II de IRIS, en los que no se reduce la proteinuria tras el tratamiento tienen peor pronóstico que aquellos perros en un estadio similar pero con una proteinuria inicial más elevada que disminuye progresivamente tras el tratamiento (Roura *et al.*, 2013).

La proteinuria presente en los perros nº 1 y 3 (UPC = 0,97 y 0,66, respectivamente) antes del tratamiento no solo no se redujo tras el tratamiento con FPA, sino que se vio incrementada a lo largo del periodo post-tratamiento (perro nº 1: UPC = 3,17 en PT3 y perro nº 3: UPC = 0,76). Asimismo, los perros nº 4, 5, 6 y 7 pasaron de no ser proteinúricos a desarrollar una proteinuria leve, con valores en PT6 de 1,1, 0,51, 0,65 y 0,62, respectivamente. Este aumento de proteinuria post-tratamiento también se ha observado, pero un número muy inferior de animales (4 de 53 perros), tras el tratamiento con antimoniales pentavalentes y alopurinol (Pierantozzi *et al.*, 2013). Por tanto, y a la vista de estos resultados, la FPA tan solo debería administrarse a perros sin alteraciones en el perfil bioquímico renal.

En cuanto al resto de alteraciones clínicopatológicas asociadas a la leishmaniosis, la hipoalbuminemia e hipergammaglobulinemia estuvieron presentes en todos los perros al comienzo del tratamiento, y persistieron tras el tratamiento con FPA. Esto mismo se ha observado tras la terapia con antimoniales pentavalentes y alopurinol (Martínez-Subiela *et al.*, 2003). En cambio, en el tercer ensayo de esta tesis, con OIPC (Hernández *et al.*, 2013), se consiguió una mejoría de estos parámetros, al igual que con la miltefosina (Miró *et al.*, 2009; Woerly *et al.*, 2009). Según Amusátegui *et al.* (1998), cuando la hipoalbuminemia es muy marcada puede persistir incluso en casos de buena respuesta al tratamiento. Además, el tiempo p.t. transcurrido antes de conseguir una normalización de la ratio A/G depende del valor inicial, de

forma que cuanto menor es el valor antes del inicio de la terapia, será necesario más tiempo para normalizar este parámetro.

La utilidad de la serología para valorar la eficacia terapéutica en la Lcan es controvertida. Mientras que algunos autores consideran que la respuesta inmune humoral no juega un papel útil en el control de la enfermedad, y por tanto, los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* no poseen un valor pronóstico (Ferrer *et al.*, 1995; Rougier *et al.*, 2012), otros consideran que la serología cuantitativa (IFI, ELISA) debería formar siempre parte del seguimiento post-tratamiento, transcurridos 4-6 meses del inicio del tratamiento (Oliva *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2011; Miró *et al.*, 2011). Asimismo, algunos autores describen una asociación entre una reducción lenta y progresiva del título de anticuerpos y una buena respuesta clínica al tratamiento (Valladares *et al.*, 1998; Riera *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2011). En nuestro estudio, también se produjo una reducción significativa en los niveles de anticuerpos a los seis meses p.t. en seis perros, pero en cambio, dicha reducción no fue acompañada de una disminución de la puntuación clínica, no hallándose, por tanto, una asociación significativa entre título de anticuerpos mediante IFI y la condición clínica. La mayor reducción del nivel de anticuerpos se produjo en el perro nº 8, desde 1/3200 hasta el punto de corte, 1/100. Esta reducción en el caso de este perro, probablemente se pudo asociar a una buena respuesta inmunitaria Th1 y a una baja carga parasitaria, como demostraron los resultados de la qPCR a lo largo del estudio en todas las muestras analizadas.

5.2.1.3. Eficacia parasitológica de FPA

En la mayoría de los estudios publicados sobre la Lcan, un elevado porcentaje de perros continúan siendo positivos en el diagnóstico parasitológico tras el tratamiento, aunque se demuestre una mejoría clínica.

La detección de ADN del kinetoplasto de amastigotes de *Leishmania* (kADN) mediante PCR está considerada la técnica más sensible para el diagnóstico parasitológico de la infección en los tejidos (Maia y Campino, 2008; Miró *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2009).

La sensibilidad de la técnica de qPCR empleada en este estudio fue de 0,001 parásitos/reacción de PCR, permitiendo discriminar entre 1 parásito/ml de muestra hasta más de 10^7 parásitos/ml de muestra (Francino *et al.*, 2006).

Al igual que ocurrió en el primer ensayo de esta tesis, la carga parasitaria varió notablemente entre los diferentes tejidos y animales, mostrando la MO mayores concentraciones de ADN del parásito que la sangre periférica, como se ha demostrado previamente (Francino *et al.*, 2006; Quaresma *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2011). La terapia con FPA no fue capaz de reducir la carga parasitaria en MO, e incluso un mes post-tratamiento en algunos animales se observó un incremento de la misma en este tejido. Una posible explicación sería la incapacidad de FPA de alcanzar la MO, o bien podría ser debido a la carga parasitaria excesivamente elevada presente en todos los animales antes del comienzo del tratamiento. Por el contrario, en sangre sí se observó una reducción en la carga parasitaria tan pronto como un mes post-tratamiento y al final del periodo de seguimiento, lo que podría sugerir que los animales serían menos infectantes para los flebotomos.

Una alternativa futura para confirmar estos resultados sería iniciar el tratamiento antes de que las cargas parasitarias sean tan elevadas.

La orina no resultó ser una buena muestra para cuantificar los parásitos, como se ha descrito por otros autores (Franceschi *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2008a), ya que la carga presente

fue baja desde antes de empezar el tratamiento, y por tanto, no sería una buena muestra donde valorar la eficacia leishmanicida de un tratamiento.

5.2.1.4. Tolerancia y seguridad de FPA

La mayoría de los compuestos empleados en el tratamiento de la Lcan pueden ser tóxicos y producir efectos adversos, en mayor o menor medida.

En el caso de la administración i.v. de AmB, los principales efectos adversos descritos incluyen nefrotoxicidad y reacciones adversas relacionadas con la perfusión endovenosa (flebitis, dolor, etc.). La aparición de estos efectos adversos es una de las principales limitaciones de la terapia de Lcan con AmB, y especialmente con Fungizona® (forma no liposomal).

La toxicidad aguda que aparece durante o tras la administración i.v. del fármaco se asocia a la producción de citoquinas proinflamatorias. Entre los efectos adversos agudos más comunes destacan: fiebre, escalofríos y rigidez, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, dolor en el lugar de la inyección con o sin flebitis, anemia, elevación de los niveles séricos de urea y creatinina, estomatitis, ictericia, fiebre, temblores y parada cardíaca, etc. (Bekersky *et al.*, 1999; Berman *et al.*, 1992; Laniado-Laborín y Cabrales-Vargas, 2009; Serrano *et al.*, 2013; Miró, 2014). Algunos de estos efectos adversos se pueden mitigar con la administración de analgésicos, heparina, antihistamínicos y/o antieméticos.

Los efectos adversos más graves en perros se han descrito con la administración i.v. de AmB deoxicolato, ocasionando la muerte de todos los perros de raza Beagle a los que se trató con una dosis de 1 mg/kg en días alternos (Bekersky *et al.*, 1999). En el mismo estudio, la administración diaria

i.v. de Ambisome (4 mg/kg) ocasionó una nefrotoxicidad moderada, incluyendo azotemia renal y nefrosis, pero no la muerte en ningún animal.

El principal efecto adverso que produce la AmB es la nefrotoxicidad, por una serie de mecanismos, lo que limita su uso en perros con leishmaniosis (Laniado-Laborín y Cabrales-Vargas, 2009). Sin embargo, a pesar de haberse descrito entre las manifestaciones clínicas de dicha nefrotoxicidad el aumento de urea y creatinina séricas, así como hipokalemia, en la segunda publicación de esta tesis, no se observaron variaciones del perfil renal a lo largo del tratamiento ni durante los 6 meses posteriores. No obstante, cuatro perros que antes del tratamiento presentaban valores de UPC fisiológicos, desarrollaron proteinuria (con valores del UPC > 0,5) al final del periodo de seguimiento. Este hecho puede atribuirse a la glomerulonefritis causada por la propia *Leishmania*, o bien a un agravamiento de dicha afección glomerular por la AmB.

La nefrotoxicidad ocasionada en los perros se ha atribuido a diversos mecanismos. Algunos estudios sugieren que esta toxicidad se debe a una mayor retroalimentación túbuloglomerular. La retroalimentación túbuloglomerular es un mecanismo normal del riñón por el que el aumento de la llegada de solutos al túbulo distal resulta en una vasoconstricción arteriolar aferente. La AmB posiblemente causa dicha vasoconstricción por su efecto sobre las membranas plasmáticas, incrementando la distribución de iones monovalentes en el túbulo distal (Laniado-Laborín y Cabrales-Vargas, 2009).

A pesar de los intentos por reducir los efectos adversos asociados a la AmB mediante el desarrollo de formulaciones menos tóxicas y con resultados prometedores en el modelo murino, el tratamiento con FPA administrado al modelo canino de esta tesis, continúa produciendo efectos

adversos descritos en numerosas ocasiones con otras formulaciones de AmB y con la propia FPA (Serrano *et al.*, 2013). Los efectos adversos observados en nuestro modelo experimental incluyeron fiebre y anorexia, descritos en la bibliografía como los signos más comunes asociados al tratamiento con Ambisome y otras formulaciones liposomadas, seguidas de hipotensión, astenia y alteraciones gastrointestinales, como diarrea y dolor abdominal.

El perro nº 8 tras recibir la segunda dosis de FPA experimentó una diarrea profusa, debilidad, hipotensión, edema periorbital y fiebre (40,1°C), siendo necesario instaurar un tratamiento sintomático con fluidoterapia intravenosa, ranitidina (Zantac®) metilprednisolona (Urbasón®) y dieta especial para trastornos gastrointestinales (i/d, Hills®). Por razones éticas tras esta reacción anafiláctica al tratamiento, este animal no recibió la tercera dosis de FPA.

El perro nº 1, a los cinco meses y medio de haber recibido la última dosis de FPA y antes de concluir el estudio presentó postración, decaimiento, debilidad e ictericia. La analítica sanguínea reveló una anemia grave no regenerativa, trombocitopenia, neutrofilia, hipoalbuminemia y gammaglobulinemia, por lo que fue necesaria su hospitalización en el Hospital Veterinario de la Universidad Complutense (HCV) para instaurar una fluidoterapia intravenosa y un tratamiento complementario a base de un complejo vitamínico B y C (Becozime C Forte®, Bayer Hispania S.L.) y sulfato ferroso (Tardyferon®, Pierre Fabre Iberica S.A.) con el fin de mejorar la anemia, y S-Adenosilmetionina (Denosyl®, Bioiberica S.A.), como protector hepático. Por razones éticas, y debido al empeoramiento progresivo se procedió a la eutanasia del animal. El examen histopatológico reveló lesiones hepáticas con presencia de amastigotes intracitoplasmáticos de *Leishmania*, una bronconeumonía fibrinosa grave con presencia de numerosos neutrófilos rellenoando las luces alveolares y entremezcladas con material

fibrinoso y neumocitos tipo II. La tinción de Gram mostró cocobacilos Gram negativos asociados a dichas lesiones. Se observó pericarditis y esplenomegalia con numerosos amastigotes de *Leishmania* en bazo y agrupaciones o clusters multifocales de células plasmáticas y fenómenos de hematopoyesis esplénica (extramedular), signo de posible anemia crónica con insuficiencia o aplasia medular. La inmunohistoquímica reveló la presencia de *Leishmania* spp., principalmente en bazo. Los hallazgos histológicos destacaron la existencia de lesiones de leishmaniosis visceral y una bronconeumonía asociada a infección por bacterias Gram negativas.

Entre las causas del empeoramiento clínico de este animal destacaron una anemia no regenerativa, hepatitis, pericarditis, así como una grave infección pulmonar por Gram negativos, las cuales no fueron asociadas al tratamiento, sino a una leishmaniosis visceral y a una neumonía bacteriana secundaria.

La falta de alteraciones clínicas y clínicopatológicas encontradas en los dos perros sanos a los que se les administró FPA, podría deberse a que tan sólo recibieron una dosis de FPA, o bien a que en animales sanos, sin Lcan ni otras alteraciones, la incidencia de reacciones adversas es menor con esta formulación.

5.2.3. Nueva alternativa terapéutica: eficacia de la oleilfosfocolina (OIPC)

Con el objeto de mejorar y facilitar el manejo actual de la Lcan, en la tercera publicación se investigó por primera vez la seguridad y eficacia de una terapia innovadora con OIPC en perros con infección natural por *L. infantum*.

OIPC es una alquilfosfocolina biodisponible oralmente que está relacionada en cuanto a su estructura con la miltefosina (Fortin *et al.*, 2012).

En estudios realizados en un modelo experimental de *L. infantum* en criceto, OIPC demostró una eficacia mayor que la miltefosina para reducir la carga parasitaria de los órganos diana tras la administración oral tanto de una única dosis como de dosis múltiples (Fortin *et al.*, 2012).

Se seleccionó la dosis oral de 4 mg/kg/24 horas administrada por la vía oral durante 14 días consecutivos ya que los resultados de seguridad obtenidos en Beagles sanos indicaron previamente que con esta dosis no se producen efectos adversos, incluso tras una pauta de administración diaria de cuatro semanas (Fortin *et al.*, datos no publicados). Sin embargo, para evitar la toxicidad asociada al tratamiento en perros clínicamente enfermos, se limitó la duración del presente estudio inicial a dos semanas.

5.2.3.1. Valoración de los animales antes del tratamiento

A todos los perros incluidos en el estudio se les diagnosticó leishmaniosis clínica. Basándonos en la clasificación clínica de Lcan propuesta recientemente por el grupo LeishVet, todos los perros fueron clasificados dentro del estadio II de leishmaniosis clínica, con excepción de los perros nº 3 y 5, clasificados como estadio III. Estos dos perros presentaban azotemia y proteinuria previas a la administración del tratamiento, pero no un cuadro clínico grave, por lo que se consideró compatible con los criterios de inclusión.

El D0, los animales mostraron una puntuación clínica media de $18,0 \pm 5,7$ puntos (media \pm DE), de un total de 74 puntos.

5.2.3.2. Eficacia clínica de OIPC

Todos los animales tratados tuvieron una buena respuesta al tratamiento en términos de mejoría clínica, y todos los signos clínicos propios de la Lcan mostraron una tendencia a disminuir, tanto en frecuencia

como en gravedad, incluyendo lesiones cutáneas, tales como dermatitis exfoliativa, formas ulcerativas, hiperqueratosis y alopecia, presentes en varios perros en el momento de la inclusión. Incluso dos perros experimentaron una remisión completa de los signos clínicos y siete aumentaron de peso. En otros estudios se han obtenido resultados de eficacia clínica similares con aminosidina (Athanasiou *et al.*, 2013), la combinación de antimonio de n-metilglucamina y alopurinol (Miró *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2012; Manna *et al.*, 2015), miltefosina (Manna *et al.*, 2009b; Mateo *et al.*, 2009; Manna *et al.*, 2015) y AmB (Lamothe, 2001). Además, el peso corporal de la mayoría de los perros se incrementó durante el periodo de seguimiento, en correlación con la mejoría clínica observada.

Además de un incremento significativo de la ratio A/G, no se observaron cambios significativos en otros parámetros hemáticos ni bioquímicos durante el periodo de seguimiento de tres meses, debido probablemente a que haría falta un periodo de tiempo mayor para apreciar más cambios. Al finalizar el periodo de seguimiento de tres meses, el tratamiento con OIPC consiguió normalizar los valores de urea y creatinina de los perros nº 3 y 5, en cambio, no consiguió revertir la proteinuria presente en dichos animales al comienzo del estudio. Por el contrario, tras el tratamiento con alopurinol (Plevraki *et al.*, 2006) o bien, con la combinación de antimonio de n-metilglucamina y alopurinol (Pierantozzi *et al.*, 2013), se ha descrito una reducción en el nivel de proteinuria en perros con leishmaniosis. No obstante, en el estudio llevado a cabo por Pierantozzi *et al.* (2013), el 45,3% de los perros tratados (24/53) fueron proteinúricos antes y después del tratamiento, aunque con una reducción significativa del UPC. Hay estudios que demuestran que el grado de proteinuria no siempre está asociado con la gravedad de las lesiones renales o el tipo de glomerulonefritis presente (Plevraki *et al.*, 2006).

Al contrario de lo ocurrido tras el tratamiento con FPA, los títulos de anticuerpos, detectados mediante la técnica de IFI, permanecieron estables, y ningún animal se volvió seronegativo al final del estudio. En cambio, la puntuación clínica total se redujo significativamente, no encontrándose por lo tanto correlación entre la mejoría clínica y los resultados de la serología. Estos resultados son similares a los publicados previamente sobre otros fármacos leishmanicidas, incluyendo la miltefosina, sugiriendo que la serología no es el parámetro adecuado para evaluar la recuperación y seguimiento en los perros tratados a corto plazo (Solano-Gallego *et al.*, 2001c; Pennisi *et al.*, 2005a; Mateo *et al.*, 2009; Miró *et al.*, 2008). Debido a que el título de anticuerpos específicos anti- *L. infantum* disminuye únicamente tras un periodo de tiempo mayor a los tres meses de nuestro estudio, sería recomendable llevar a cabo un seguimiento más largo para poder valorar la cinética de anticuerpos a lo largo del tiempo.

5.2.3.3. Eficacia parasitológica de OIPC

A pesar de que la observación microscópica de extensiones teñidas de MO es una técnica rápida y ampliamente definida en las clínicas veterinarias para detección de amastigotes de *Leishmania*, se considera que tiene una sensibilidad baja, entre 60-75% (Alvar *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2007) y puede resultar difícil demostrar la presencia de parásitos en la muestra debido a su baja o moderada carga (Moreira *et al.*, 2007; Baneth y Aroch, 2008). En nuestro estudio, todas las citologías de MO fueron analizadas por el mismo personal cualificado y especializado. El número de perros con citologías de MO positivas al final del ensayo fue de cuatro (de los seis que se obtuvo muestra el D90) y mientras que se obtuvo una sensibilidad similar a la del cultivo, ambas técnicas mostraron una sensibilidad menor en comparación con la de la nPCR. En este estudio, se identificó ADN de *L. infantum* en la MO y/o sangre de seis perros (de los siete

analizados) mediante nPCR al final del periodo de seguimiento, confirmando que con el tratamiento con OIPC a la dosis administrada no se consigue una curación parasitológica. Estos resultados son similares a los publicados en otros estudios que utilizan la PCR para valorar la eficacia parasitológica, como en el caso de la miltefosina (Manna *et al.*, 2009b; Mateo *et al.*, 2009) y los antimoniales (Francino *et al.*, 2006; Manna *et al.*, 2008b).

La diana empleada en la nPCR fue el gen SSUrRNA, el cual permite amplificar todas las especies de *Leishmania* de manera específica sin obtener resultados falsos positivos. A pesar de haberse descrito una sensibilidad ligeramente inferior de los métodos que emplean esta diana molecular en comparación con los que emplean kADN (Cruz *et al.*, 2013), Cruz *et al.* (2002) obtuvieron una sensibilidad del 100% en MO y 95,45% en sangre mediante nPCR empleando como diana el gen SSUrRNA con cebadores específicos. Además, la sensibilidad de esta nPCR se vio incrementada al analizar la curva de *melting*, ya que permite identificar los productos obtenidos y determinar si ha ocurrido una amplificación inespecífica, no siendo necesaria la electroforesis de los productos de PCR para su posterior identificación.

Además de la nPCR, se empleó la qPCR para determinar de forma más precisa la eficacia leishmanicida de la OIPC en los tejidos mediante la cuantificación de la carga parasitaria residual el D90 y comparándola con el D0 (Francino *et al.*, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2008b). Esta técnica demostró que tras el tratamiento con OIPC se redujo la carga parasitaria media en las muestras de MO que habían resultado positivas por nPCR en más del 95%. La qPCR no detectó una cantidad significativa de parásitos en las muestras de sangre de los D0 y D90, lo que indica, como se ha explicado anteriormente, que la sangre no es tan sensible como las muestras de MO para cuantificar la carga parasitaria de *Leishmania* (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2008b; Maia *et al.*, 2009).

La presencia de los parásitos residuales no produjo recaídas clínicas en ninguno de los perros durante los tres meses de seguimiento, aunque dicho periodo de tiempo se consideraría corto para poder valorarlo. A este respecto, Manna *et al.* (2008b) y Andrade *et al.* (2011) observaron un incremento progresivo en la carga parasitaria, especialmente tras los seis primeros meses post-tratamiento.

5.2.3.1. Tolerancia y seguridad de OIPC

En cuanto a la seguridad de este fármaco, tan sólo tres de los ocho perros tratados desarrollaron durante la primera semana de tratamiento trastornos gastrointestinales, como vómitos y diarrea, de curso autolimitante y leve, que no requirieron de ningún tratamiento complementario. Dichos efectos adversos fueron similares a los descritos con el uso de la miltefosina (Mateo *et al.*, 2009; Woerly *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2011). Sería interesante en el futuro valorar la combinación de OIPC junto con alopurinol, no sólo por su posible mayor eficacia, sino también porque la combinación con miltefosina no ha mostrado reacciones adversas en perros (Miró *et al.*, 2009).

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

PRIMERA. La detección de ADN de *Leishmania infantum* mediante PCR cuantitativa con muestras de médula ósea demostró una mayor sensibilidad que la obtenida con el resto de las muestras analizadas. En cuanto a las muestras no invasivas, la sensibilidad más elevada de la PCR cuantitativa fue la obtenida utilizando hisopos de mucosa vulvar seguido de mucosa oral, pudiendo considerarse una alternativa en el diagnóstico de la leishmaniosis canina. Por el contrario, la sensibilidad de esta técnica diagnóstica con muestras de orina fue muy baja, por lo que no parece una muestra adecuada para cuantificar la carga parasitaria.

SEGUNDA. El tratamiento con anfotericina B en estado poliagregado (FPA) en perros con infección experimental por *Leishmania infantum* demostró una escasa eficacia clínica (tanto respecto a la mejoría de los signos clínicos como de las alteraciones clínicopatológicas), y una reducida eficacia leishmanicida evidenciada por la ausencia de reducción de la carga parasitaria obtenida mediante PCR cuantitativa en muestras de médula ósea.

TERCERA. La administración endovenosa de FPA ocasionó efectos adversos graves de distinta consideración a lo largo de un periodo de seis meses de estudio en los perros tratados. La baja tolerancia de esta molécula no hace recomendable su uso en el tratamiento de la leishmaniosis canina.

CUARTA. El tratamiento con oleilfosfocolina en perros con infección natural por *Leishmania infantum* reveló una buena eficacia clínica (tanto respecto a la mejoría de los signos clínicos como de las alteraciones clínicopatológicas), y una moderada eficacia leishmanicida valorada por la reducción de la carga parasitaria en muestras de médula ósea. Además, la tolerancia de esta molécula puede considerarse buena a la vista de los efectos adversos leves ocasionados en los perros tratados a lo largo de un periodo de tres meses de estudio.

Y QUINTA. Aunque son necesarios nuevos estudios con un mayor número de animales, y durante un periodo de estudio más prolongado, los resultados preliminares sobre eficacia parasitológica, clínica, y tolerancia de la oleilfosfocolina hacen de esta molécula una prometedora alternativa en el tratamiento de perros con leishmaniosis clínica.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abranches P., Santos-Gomes, G., Rachamim, N., Campino, L., Schnur, L.F. and Jaffe, C.L. (1991). An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 13, 537-550.
- Adamama-Moraitou, K.K., Rallis, T.S., Koytinas, A.F., Tontis, D., Plevraki, K. and Kritsepi, M. (2007). Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *Am J Trop Med Hyg*, 76, 53-57.
- Adler, S. and Theodor, O. (1931). Skin infection in canine visceral leishmaniasis. *Brit. Med. J.*, 2, 1179.
- Afonso, M.M., Duarte, R., Miranda, J.C., Caranha, L. and Rangel, E.F. (2012). Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz y Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. *J Trop Med*, 2012, 858657.
- Agut, A., Corzo, N., Murciano, J., Laredo, F.G. and Soler, M. (2003). Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Vet Rec*, 153, 648-652.
- Aisa, M.J., Castillejo, S., Gallego, M., Fisa, R., Riera, M.C., de Colmenares, M., Torras, S., Roura, X., Sentis, J. and Portus, M. (1998). Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am J Trop Med Hyg*, 58, 154-159.
- Alam, M.Z., Yasin, G., Kato, H., Sakurai, T. and Katakura, K. (2013). PCR-based detection of *Leishmania donovani* DNA in a stray dog from a visceral leishmaniasis endemic focus in Bangladesh. *J Vet Med Sci*, 75, 75-78.
- Alexander, B., de Carvalho, R.L., McCallum, H. and Pereira, M.H. (2002). Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis*, 8, 1480-1485.
- Alexander, B. and Maroli, M. (2003). Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*, 17, 1-18.
- Alexandre-Pires, G., Pais, D., Correia, M. and Pina, J.A. (2006). Leishmaniosis—a report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. *Microsc Res Tech*, 69, 227-235.
- Almeida, A.B., Sousa, V.R., Gasparetto, N.D., da Silva, G.F., Figueiredo, F.B., Dutra, V., Nakazato, L. and Madeira, M.F. (2013). Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 76, 321-324.
- Almeida, M.A., Jesus, E.E., Sousa-Atta, M.L., Alves, L.C., Berne, M.E. and Atta, A.M. (2005). Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol*, 127, 227-232.
- Alonso, F., Giménez Font, P., Manchón, M., Ruiz de Ybáñez, R., Segovia, M. and Berriatua, E. (2010). Geographical variation and factors associated to seroprevalence of canine leishmaniosis in an endemic Mediterranean area. *Zoonoses Public Health*, 57, 318-328.
- Alvar, J., Molina, R., San Andrés, M., Tesouro, M., Nieto, J., Vitutia, M., González, F., San Andrés, M. D., Boggio, J. and Rodríguez, F. (1994). Canine leishmaniasis: clinical,

- parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol*, 88, 371-378.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J. and Nieto, J. (2004).** Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*, 57, 1-88.
- Alvar, J., Yactayo, S. and Bern, C. (2006).** Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*, 22, 552-557.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. and Team, W.L.C. (2012).** Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7, e35671.
- Alves, G.B., Pinho, F.A., Silva, S.M., Cruz, M.S. and Costa, F.A. (2010).** Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Braz J Med Biol Res*, 43, 310-315.
- Amela, C., Mendez, I., Torcal, J.M., Medina, G., Pachón, I., Cañavate, C. and Alvar, J. (1995).** Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur J Epidemiol*, 11, 157-161.
- Amusátegui, I., Sainz, A. and Tesouro, M.A. (1998).** Evolution of serum albumin/globulin ratio after antimonial therapy in canine leishmaniasis. *Ann N Y Acad Sci*, 849, 447-449.
- Andrade, G.B., Barreto, W.T., Santos, L.L., Ribeiro, L.R., Macedo, G.C., Sousa, K.C., André, M.R., Machado, R.Z. and Herrera, H.M. (2014).** Pathology of dogs in Campo Grande, MS, Brazil naturally co-infected with *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *Rev Bras Parasitol Vet*, 23, 509-515.
- Andrade, H.M., Toledo, V.P., Pinheiro, M.B., Guimarães, T.M., Oliveira, N.C., Castro, J.A., Silva, R.N., Amorim, A.C., Brandão, R.M., Yoko, M., Silva, A.S., Dumont, K., Ribeiro, M.L., Bartchewsky, W. and Monte, S.J. (2011).** Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. *Vet Parasitol*, 181, 83-90.
- Andrade, R.A., Silva Araújo, M.S., Reis, A.B., Gontijo, C.M., Vianna, L.R., Mayrink, W. and Martins-Filho, O.A. (2009).** Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. *Vet Immunol Immunopathol*, 128, 79-86.
- Anjili, C.O., Mbatia, P.A., Mwangi, R.W., Githure, J.I., Olobo, J.O., Robert, L.L. and Koech, D.K. (1995).** The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Trop*, 60, 97-100.
- Antinori, S., Cascio, A., Parravicini, C., Bianchi, R. and Corbellino, M. (2008).** Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis*, 8, 191-199.
- Antoine, J.C., Prina, E., Jouanne, C. and Bongrand, P. (1990).** Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect Immun*, 58, 779-787.
- Antoniou, M., Haralambous, C., Mazeris, A., Pralong, F., Dedet, J. P. and Soteriadou, K. (2008).** *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis*, 8, 6-7.
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V. and Volf, P. (2013).** The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro Surveill*, 18, 20540.
- Aoun, K., Chouih, E., Boufaden, I., Mahmoud, R., Bouratbine, A. and Bedoui, K. (2008).** Efficacy of Deltamethrine-impregnated collars Scalibor in the prevention of canine leishmaniasis in the area of Tunis. *Arch Inst Pasteur Tunis*, 85, 63-68.

- Aransay, A.M., Testa, J.M., Morillas-Marquez, F., Lucientes, J. and Ready, P.D. (2004). Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitol Res*, 94, 416-420.
- Araújo, M.S., de Andrade, R.A., Vianna, L.R., Mayrink, W., Reis, A.B., Sathler-Avelar, R., Teixeira-Carvalho, A., Andrade, M.C., Mello, M.N. and Martins-Filho, O.A. (2008). Despite Leishvaccine and Leishmune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 26, 2211-2224.
- Araújo, M.S., de Andrade, R.A., Sathler-Avelar, R., Magalhães, C.P., Carvalho, A.T., Andrade, M.C., Campolina, S.S., Mello, M.N., Vianna, L.R., Mayrink, W., Reis, A.B., Malaquias, L.C., Rocha, L.M. and Martins-Filho, O.A. (2011). Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 141, 64-75.
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martínez, A.M., Pérez, A.M., Aránguez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J. and Vilas, F. (2013). Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*, 18, 20546.
- Aresu, L., Benali, S., Ferro, S., Vittone, V., Gallo, E., Brovida, C. and Castagnaro, M. (2013). Light and electron microscopic analysis of consecutive renal biopsy specimens from leishmania-seropositive dogs. *Vet Pathol*, 50, 753-760.
- Aránguez, E., Arce, A., Moratilla, L., Estirado, A., Iriso, A., de la Fuente, S., Soto, M., Fuster, F., Ordobás, M., María, A. and Vilas, F. (2014). Análisis espacial de un brote de leishmaniasis en el sur del Área metropolitana de la Comunidad de Madrid. 2009-2013. *Revista de Salud Ambiental*, 14, 39-53.
- Ashford, R.W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, 30, 1269-1281.
- Aste, G., Di Tommaso, M., Steiner, J.M., Williams, D.A. and Boari, A. (2005). Pancreatitis associated with N-methyl-glucamine therapy in a dog with leishmaniasis. *Vet Res Commun*, 29 Suppl 2, 269-272.
- Athanasiou, L.V., Kontos, V.I., Saridomichelakis, M.N., Rallis, T.S. and Diakou, A. (2012). A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. *Acta Trop*, 122, 291-295.
- Athanasiou, L.V., Saridomichelakis, M.N., Kontos, V.I., Spanakos, G. and Rallis, T.S. (2013). Treatment of canine leishmaniasis with aminosidine at an optimized dosage regimen: A pilot open clinical trial. *Vet Parasitol*, 192, 91-97.
- Athanasiou, L.V., Petanides, T.A., Chatzis, M.K., Kasabalis, D., Apostolidis, K.N. and Saridomichelakis, M.N. (2014). Comparison of two commercial rapid in-clinic serological tests for detection of antibodies against *Leishmania* spp. in dogs. *J Vet Diagn Invest*, 26, 286-290.
- Awasthi, A., Mathur, R.K. and Saha, B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*, 119, 238-258.
- Babudze, G., Alvar, J., Argaw, D., de Koning, H.P., Iosava, M., Kekelidze, M., Tsertsvadze, N., Tsereteli, D., Chakhunashvili, G., Mamatsashvili, T., Beria, N., Kalandadze, I., Ejov, M. and Imnadze, P. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis in Georgia. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e2725.

- Baneth, G. and Shaw, S.E. (2002).** Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 106, 315-324.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. and Ferrer, L. (2008).** Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*, 24, 324-330.
- Baneth, G., Zivotofsky, D., Nachum-Biala, Y., Yasur-Landau, D. and Botero, A.M. (2014).** Mucocutaneous *Leishmania tropica* infection in a dog from a human cutaneous leishmaniasis focus. *Parasit Vectors*, 7, 118.
- Barrouin-Melo, S. M., Larangeira, D.F., Trigo, J., Aguiar, P.H., dos-Santos, W.L. and Pontes de Carvalho, L. (2004).** Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99, 195-197.
- Barta, O. (1992).** Immunoadjuvant therapy. En: Kirk's Current Veterinary Therapy XI. Small Animal Practice. Kirk & Bonagua (eds.). WB Saunders Company, Philadelphia. 217-223.
- Bartlett, K., Yau, E., Hartsel, S.C., Hamer, A., Tsai, G., Bizzotto, D. and Wasan, K.M. (2004).** Effect of heat-treated amphotericin B on renal and fungal cytotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 333-336.
- Bates, P.A. (2007).** Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, 37, 1097-1106.
- Bañuls, A.L., Hide, M. and Prugnolle, F. (2007).** *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*, 64, 1-109.
- Bekersky, I., Fielding, R.M., Dressler, D.E., Lee, J.W., Buell, D.N. and Walsh, T.J. (2002).** Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 828-833.
- Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Parejo, J.C., Fernández-Cotrino, J., Muñoz-Madrid, R., Soto, M., Alonso, C. and Gómez Nieto, L.C. (2013).** Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 192, 43-50.
- Belloli, C., Ceci, L., Carli, S., Tassi, P., Montesissa, C., De Natale, G., Marcotrigiano, G. and Ormas, P. (1995).** Disposition of antimony and aminosidine in dogs after administration separately and together: implications for therapy of leishmaniasis. *Res Vet Sci*, 58, 123-127.
- Ben Slimane, T., Chouih, E., Ben Hadj Ahmed, S., Chelbi, I., Barhoumi, W., Cherni, S., Zoghalmi, Z., Gharbi, M. and Zhioua, E. (2014).** An investigation on vertical transmission of *Leishmania infantum* in experimentally infected dogs and assessment of offspring's infectiousness potential by xenodiagnosis. *Vet Parasitol*, 206, 282-286.
- Berczi, I., Bertók, L. and Chow, D. A. (2000).** Natural immunity and neuroimmune host defense. *Ann N Y Acad Sci*, 917, 248-257.
- Berman, J.D., Waddell, D. and Hanson, B.D. (1985).** Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother*, 27, 916-920.
- Berman, J.D., Ksionski, G., Chapman, W.L., Waits, V.B. and Hanson, W.L. (1992).** Activity of amphotericin B cholesterol dispersion (Amphocil) in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 36, 1978-1980.

- Berman, J. (2006). Visceral leishmaniasis in the New World and Africa. *Indian J Med Res*, 123, 289-294.
- Bettini, S., Gramiccia, M., Gradoni, L. and Atzeni, M.C. (1986). Leishmaniasis in Sardinia: II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, in the province of Cagliari. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 80, 458-459.
- Beugnet, F. and Franc, M. (2012). Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. *Trends Parasitol*, 28, 267-279.
- Bhandari, V., Kulshrestha, A., Deep, D. K., Stark, O., Prajapati, V.K., Ramesh, V., Sundar, S., Schonian, G., Dujardin, J.C. and Salotra, P. (2012). Drug susceptibility in *Leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1657.
- Bhaumik, S.K., Singh, M., Basu, R., Bhaumik, S., Roychoudhury, K., Naskar, K., Roy, S. and De, T. (2008). Virulence attenuation of a UDP-galactose/N-acetylglucosamine beta1,4 galactosyltransferase expressing *Leishmania donovani* promastigote. *Glycoconj J*, 25, 459-472.
- Bianciardi, P., Fasanella, A., Foglia Manzillo, V., Trotta, T., Pagano, A., Sorino, S., Gradoni, L. and Oliva, G. (2004). The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. *Parasitol Res*, 93, 486-492.
- Bianciardi, P., Brovida, C., Valente, M., Aresu, L., Cavicchioli, L., Vischer, C., Giroud, L. and Castagnaro, M. (2009). Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs: clinicopathological evaluation of the impact on the kidneys. *Toxicol Pathol*, 37, 770-775.
- Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, P., Goy-Thollot, I., Chabanne, L., Cadoré, J. L. and Bourdoiseau, G. (2001). Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet J*, 162, 108-120.
- Boehme, C. C., Hain, U., Novosel, A., Eichenlaub, S., Fleischmann, E. and Löscher, T. (2006). Congenital visceral leishmaniasis. *Emerg Infect Dis*, 12, 359-360.
- Boggiatto, P.M., Ramer-Tait, A.E., Metz, K., Kramer, E.E., Gibson-Corley, K., Mullin, K., Hostetter, J.M., Gallup, J.M., Jones, D.E. and Petersen, C.A. (2010). Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clin Vaccine Immunol*, 17, 267-273.
- Boggiatto, P.M., Gibson-Corley, K.N., Metz, K., Gallup, J.M., Hostetter, J.M., Mullin, K. and Petersen, C.A. (2011). Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Negl Trop Dis*, 5, e1019.
- Bongiorno, G., Paparcone, R., Foglia Manzillo, V., Oliva, G., Cuisinier, A. M. and Gradoni, L. (2013). Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs—a preliminary xenodiagnosis study. *Vet Parasitol*, 197, 691-695.
- Borja-Cabrera, G.P., Correia Pontes, N.N., da Silva, V.O., Paraguai de Souza, E., Santos, W.R., Gomes, E.M., Luz, K.G., Palatnik, M. and Palatnik de Sousa, C.B. (2002). Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 20, 3277-3284.
- Borja-Cabrera, G.P., Santos, F.N., Bauer, F.S., Parra, L.E., Menz, I., Morgado, A.A., Soares, I.S., Batista, L.M. and Palatnik-de-Sousa, C.B. (2008). Immunogenicity assay

- of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*, 26, 4991-4997.
- Borja-Cabrera, G.P., Santos, F.N., Santos, F.B., Trivellato, F.A., Kawasaki, J.K., Costa, A.C., Castro, T., Nogueira, F.S., Moreira, M.A., Luvizotto, M.C., Palatnik, M. and Palatnik-de-Sousa, C.B. (2010).** Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 28, 597-603.
- Bourdeau, P., Saridomichelakis, M.N., Oliveira, A., Oliva, G., Kotnik, T., Gálvez, R., Foglia Manzillo, V., Koutinas, A.F., Pereira da Fonseca, I. and Miró, G. (2014).** Management of canine leishmaniosis in endemic SW European regions: a questionnaire-based multinational survey. *Parasit Vectors*, 7, 110.
- Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Gonçalves, R.B., Vézilier, F., Petit-Didier, E., Papierok, G. and Lemesre, J.L. (2009).** Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 128, 71-78.
- Brandonisio, O., Ceci, L., Cedola, M.C., Caretto, G., Antonaci, S. and Jirillo, E. (1986).** Phagocytosis of *Leishmania infantum* promastigotes by monocytes isolated from *Leishmania*-infected dogs. *Microbiologica*, 9, 173-178.
- Brandonisio, O., Carelli, G., Altamura, M., Varvara, B. and Ceci, L. (1990).** Circulating immune complexes and autoantibodies in canine leishmaniasis. *Parassitologia*, 32, 275-281.
- Brandonisio, O., Panunzio, M., Faliero, S.M., Ceci, L., Fasanella, A. and Puccini, V. (1996).** Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 53, 95-103.
- Bray, D.P. and Hamilton, J.G. (2013).** Insecticide-impregnated netting as a potential tool for long-lasting control of the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* in animal shelters. *Parasit Vectors*, 6, 133.
- Breton, M., Tremblay, M.J., Ouellette, M. and Papadopoulos, B. (2005).** Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, 73, 6372-6382.
- Brianti, E., Falsone, L., Napoli, E., Prudente, C., Gaglio, G. and Giannetto, S. (2013).** Efficacy of a combination of 10% imidacloprid and 4.5% flumethrin (Seresto®) in slow release collars to control ticks and fleas in highly infested dog communities. *Parasit Vectors*, 6, 210.
- Brianti, E., Gaglio, G., Napoli, E., Falsone, L., Prudente, C., Solari Basano, F., Latrofa, M.S., Tarallo, V. D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Stanneck, D., Giannetto, S. and Otranto, D. (2014).** Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*, 7, 327.
- Cabral, M., O'Grady, J.E., Gomes, S., Sousa, J.C., Thompson, H. and Alexander, J. (1998).** The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol*, 76, 173-180.
- Calvo-Álvarez, E., Guerrero, N.A., Alvarez-Velilla, R., Prada, C.F., Requena, J.M., Punzón, C., Llamas, M., Arévalo, F.J., Rivas, L., Fresno, M., Pérez-Pertejo, Y., Balaña-Fouce, R. and Reguera, R.M. (2012).** Appraisal of a *Leishmania major* strain stably expressing mCherry fluorescent protein for both *in vitro* and *in vivo* studies of potential drugs and vaccine against cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1927.

- Campino, L., Santos-Gomes, G., Riça Capela, M.J., Cortes, S. and Abranches, P. (2000). Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 92, 269-275.
- Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Nolan, M.J. and Otranto, D. (2015). The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends Parasitol*, 31, 100-108.
- Carcelén, J., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Serrano, F., Parejo, J.C., Corraliza, I., Gallardo-Soler, A., Marañón, F., Soto, M., Alonso, C. and Gómez-Nieto, C. (2009). The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine*, 27, 5964-5973.
- Cardoso, L., Neto, F., Sousa, J. C., Rodrigues, M. and Cabral, M. (1998). Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol*, 79, 213-220.
- Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G.J., Carreta, P., Varejão, E., van Benthem, B., Afonso, M O., Alves-Pires, C., Semião-Santos, S.J., Rodrigues, J. and Schallig, H.D. (2004). Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Vet Parasitol*, 121, 21-32.
- Carrera, L., Fermín, M.L., Tesouro, M., García, P., Rollán, E., González, J.L., Méndez, S., Cuquerella, M. and Alunda, J.M. (1996). Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp Parasitol*, 82, 139-146.
- Carrillo, E. and Moreno, J. (2009). Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 128, 67-70.
- Carrillo, E., Moreno, J. and Cruz, I. (2013). What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid? *Trends in Parasitology*. 29, 579-580.
- Carrió, J. and Portús, M. (2002). *In vitro* susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during *in vitro* or *in vivo* passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *BMC Pharmacol*, 2, 11.
- Carson, C., Antoniou, M., Ruiz-Argüello, M.B., Alcamí, A., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Blackwell, J.M. and Courtenay, O. (2009). A prime/boost DNA/Modified vaccinia virus Ankara vaccine expressing recombinant *Leishmania* DNA encoding TRYP is safe and immunogenic in outbred dogs, the reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 27, 1080-1086.
- Carson, C., Quinnell, R. J., Day, M.J. and Courtenay, O. (2010). Comparison of monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of canine IgG1 and IgG2, and associations with infection outcome in *Leishmania infantum* naturally infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 133, 264-268.
- Carvalho Ferreira, A.L., Carregal, V.M., de Almeida Ferreira, S., Leite, R.S. and de Andrade, A.S. (2014). Detection of *Leishmania infantum* in 4 different dog samples by real-time PCR and ITS-1 nested PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78, 418-421.
- Casanova, C., Andrighetti, M.T., Sampaio, S.M., Marcoris, M.L., Colla-Jacques, F.E. and Prado, A.P. (2013). Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in Southeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2443.
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 73, 203-266.

- Chamaillé, L., Tran, A., Meunier, A., Bourdoiseau, G., Ready, P. and Dedet, J.P. (2010).** Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasit Vectors*, 3, 31.
- Chapman, W.L. and Hanson, W.L. (1981).** Visceral leishmaniasis in the squirrel monkey (*Saimiri sciurea*). *J Parasitol*, 67, 740-741.
- Chapman, W.L., Hanson, W.L. and Hendricks, L.D. (1983).** Toxicity and efficacy of the antileishmanial drug meglumine antimoniate in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *J Parasitol*, 69, 1176-1177.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J. and Boelaert, M. (2007).** Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, 5, 873-882.
- Chatzis, M.K., Andreadou, M., Leontides, L., Kasabalis, D., Mylonakis, M., Koutinas, A.F., Rallis, T., Ikononopoulos, J. and Saridomichelakis, M.N. (2014).** Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. *Vet Parasitol*, 202, 217-225.
- Ciaramella, P., Oliva, G., Luna, R. D., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A. and Persechino, A. (1997).** A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*, 141, 539-543.
- Ciaramella, P. and Corona, M. (2003).** Canine leishmaniasis: therapeutic aspects. *Comp. Cont. Educ. Pract*, 25, 370-375.
- Ciaramella, P., Pelagalli, A., Cortese, L., Pero, M. E., Corona, M., Lombardi, P., Avallone, L. and Persechino, A. (2005).** Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J*, 169, 465-467.
- Cleare, E., Mason, K., Mills, J., Gabor, M. and Irwin, P.J. (2014).** Remaining vigilant for the exotic: cases of imported canine leishmaniosis in Australia 2000-2011. *Aust Vet J*, 92, 119-127.
- Coelho, W.M. and Bresciani, K.D. (2013).** Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in a dipteran of the species *Tabanus importunus*. *Rev Bras Parasitol Vet*, 22, 605-607.
- Coler, R.N. and Reed, S.G. (2005).** Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 21, 244-249.
- Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Cheng, L., Laughinghouse, A., Ward, J.M., Elnaiem, D.E., Fischer, L., Valenzuela, J.G. and Kamhawi, S. (2009).** Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. *PLoS Pathog*, 5, e1000441.
- Convit, J., Castellanos, P.L., Rondon, A., Pinardi, M. E., Ulrich, M., Castes, M., Bloom, B. and Garcia, L. (1987).** Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. *Lancet*, 1, 401-405.
- Cordeiro-da-Silva, A., Cardoso, L., Araújo, N., Castro, H., Tomás, A., Rodrigues, M., Cabral, M., Vergnes, B., Sereno, D. and Ouassiss, A. (2003).** Identification of antibodies to *Leishmania* silent information regulatory 2 (SIR2) protein homologue during canine natural infections: pathological implications. *Immunol Lett*, 86, 155-162.
- Cortadellas, O. (2003).** Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis. *J Vet Intern Med*, 17, 808-812.

- Cortadellas, O., del Palacio, M.J., Bayón, A., Albert, A. and Talavera, J. (2006).** Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *J Vet Intern Med*, 20, 941-947.
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. and Campino, L. (2012).** Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet Parasitol*, 189, 189-196.
- Cortese, L., Pelagalli, A., Piantedosi, D., Mastellone, V., Manco, A., Lombardi, P., Ciaramella, P. and Avallone, L. (2006).** Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 53, 546-548.
- Cortese, L., Sica, M., Piantedosi, D., Ruggiero, G., Pero, M.E., Terrazzano, G., Mastellone, V. and Ciaramella, P. (2009).** Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*, 164, 778-782.
- Costa, C.H. (2011).** How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop*, 44, 232-242.
- Costa, D.J., Carvalho, R.M., Abbehusen, M., Teixeira, C., Pitombo, M., Trigo, J., Nascimento, F., Amorim, L., Abreu-Silva, A.L., do Socorro Pires Cruz, M., Miranda, J.C., Fukutani, K., de Oliveira, C.I., Barral, A., Barral-Netto, M. and Brodskyn, C. (2013).** Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as a model to study Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS One*, 8, e60535.
- Costa, F.A., Goto, H., Saldanha, L.C., Silva, S.M., Sinhorini, I.L., Silva, T.C. and Guerra, J.L. (2003).** Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol*, 40, 677-684.
- Coura-Vital, W., Marques, M.J., Veloso, V.M., Roatt, B.M., Aguiar-Soares, R.D., Reis, L.E., Braga, S.L., Morais, M.H., Reis, A.B. and Carneiro, M. (2011).** Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Negl Trop Dis*, 5, e1291.
- Coura-Vital, W., Ker, H.G., Roatt, B.M., Aguiar-Soares, R.D., Leal, G.G., Moreira, N., Oliveira, L.A., de Menezes Machado, E.M., Morais, M.H., Corrêa-Oliveira, R., Carneiro, M. and Reis, A.B. (2014).** Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLoS One*, 9, e91009.
- Courret, N., Lang, T., Milon, G. and Antoine, J.C. (2003).** Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int J Parasitol*, 33, 1373-1383.
- Courtenay, O., Quinnell, R.J., Garcez, L.M., Shaw, J.J. and Dye, C. (2002).** Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis*, 186, 1314-1320.
- Coutinho, M.T., Bueno, L.L., Sterzik, A., Fujiwara, R.T., Botelho, J.R., De Maria, M., Genaro, O. and Linardi, P.M. (2005).** Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 128, 149-155.
- Coutinho, M.T. and Linardi, P.M. (2007).** Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet Parasitol*, 147, 320-325.

- Criado-Fornelio, A., Gutierrez-Garcia, L., Rodriguez-Caabeiro, F., Reus-Garcia, E., Roldan-Soriano, M.A. and Diaz-Sanchez, M.A. (2000). A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet Parasitol*, 92, 245-251.
- Croft, S.L., Snowdon, D. and Yardley, V. (1996). The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother*, 38, 1041-1047.
- Croft, S.L., Sundar, S. and Fairlamb, A.H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*, 19, 111-126.
- Cruz, I., Morales, M.A., Noguer, I., Rodríguez, A. and Alvar, J. (2002). *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*, 359, 1124-1125.
- Cruz, I., Millet, A., Carrillo, E., Chenik, M., Salotra, P., Verma, S., Veland, N., Jara, M., Adai, V., Castrillón, C., Arévalo, J., Moreno, J. and Cañavate, C. (2013). An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Exp Parasitol*, 134, 281-289.
- Cruz-Chan, J.V., Aguilar-Cetina, A.e.C., Villanueva-Lizama, L.E., Martínez-Vega, P.P., Ramírez-Sierra, M.J., Rosado-Vallado, M.E., Guillermo-Cordero, J.L. and Dumonteil, E. (2014). A canine model of experimental infection with *Leishmania (L.) mexicana*. *Parasit Vectors*, 7, 361.
- Da Costa-Val, A.P., Cavalcanti, R.R., de Figueiredo Gontijo, N., Michalick, M.S., Alexander, B., Williams, P. and Melo, M.N. (2007). Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J*, 174, 636-643.
- Da Silva, A.V., de Souza Cândido, C.D., de Pita Pereira, D., Brazil, R.P. and Carreira, J.C. (2008). The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop*, 105, 92-94.
- Da Silva, S.M., Ribeiro, V.M., Ribeiro, R.R., Tafuri, W.L., Melo, M.N. and Michalick, M.S. (2009). First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Vet Parasitol*, 166, 159-162.
- Da Silva, S.M., Rabelo, P.F., Gontijo, N.e.F., Ribeiro, R.R., Melo, M.N., Ribeiro, V.M. and Michalick, M.S. (2010). First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet Parasitol*, 174, 150-154.
- Da Silva, S.M., Amorim, I.F., Ribeiro, R.R., Azevedo, E.G., Demicheli, C., Melo, M.N., Tafuri, W.L., Gontijo, N.F., Michalick, M.S. and Frézard, F. (2012). Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 2858-2867.
- Da Silva, V.O., Borja-Cabrera, G.P., Correia Pontes, N.N., de Souza, E.P., Luz, K.G., Palatnik, M. and Palatnik de Sousa, C.B. (2000). A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine*, 19, 1082-1092.
- Daftarian, P.M., Stone, G.W., Kovalski, L., Kumar, M., Vosoughi, A., Urbiet, M., Blackwelder, P., Dikici, E., Serafini, P., Duffort, S., Boodoo, R., Rodríguez-Cortés, A., Lemmon, V., Deo, S., Alberola, J., Perez, V.L., Daunert, S. and Ager, A L. (2013). A targeted and adjuvanted nanocarrier lowers the effective dose of liposomal amphotericin B and enhances adaptive immunity in murine cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*, 208, 1914-1922.

- Dantas-Torres, F. (2006). Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet Parasitol*, 141, 1-8.
- Dantas-Torres, F., de Brito, M.E. and Brandão-Filho, S.P. (2006). Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol*, 140, 54-60.
- Dantas-Torres, F. (2009). Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors*, 2, Suppl 1, S1.
- Dantas-Torres, F., de Paiva-Cavalcanti, M., Figueredo, L.A., Melo, M.F., da Silva, F.J., da Silva, A.L., Almeida, E. L. and Brandão-Filho, S.P. (2010). Cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. *Vet Parasitol*, 170, 313-317.
- Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S. and Otranto, D. (2011). Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors*, 4, 56.
- Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V.M., de Paiva-Cavalcanti, M. and Otranto, D. (2012). Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol*, 28, 531-538.
- Dantas-Torres, F. and Otranto, D. (2014). When is an "asymptomatic" dog asymptomatic? *Vet Parasitol*, 202, 341-342.
- Dantas-Torres, F., Tarallo, V.D., Latrofa, M.S., Falchi, A., Lia, R.P. and Otranto, D. (2014). Ecology of phlebotomine sand flies and *Leishmania infantum* infection in a rural area of southern Italy. *Acta Trop*, 137, 67-73.
- Davidson, R.N., den Boer, M. and Ritmeijer, K. (2009). Paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103, 653-660.
- Davoust, B., Roqueplo, C., Parzy, D., Watier-Grillot, S. and Marié, J.L. (2013). A twenty-year follow-up of canine leishmaniosis in three military kennels in southeastern France. *Parasit Vectors*, 6, 323.
- Day, M.J. (2007). Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet Parasitol*, 147, 2-8.
- De Almeida, A.B., Sousa, V.R., Sorte, C., Figueiredo, F.B., de Paula, D.A., Pimentel, M.F., Dutra, V. and Madeira, F. (2011). Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11, 1555-1560.
- De Almeida Ferreira, S., Leite, R.S., Ituassu, L.T., Almeida, G.G., Souza, D.M., Fujiwara, R.T., de Andrade, A.S. and Melo, M.N. (2012). Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1596.
- De Almeida, M.C., Vilhena, V., Barral, A. and Barral-Netto, M. (2003). Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98, 861-870.
- De Araújo, V.A., Boité, M.C., Cupolillo, E., Jansen, A.M. and Roque, A.L. (2013). Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: Pilosa) from Pará State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. *Parasitology*, 140, 455-460.
- De Freitas, E., Melo, M.N., da Costa-Val, A.P. and Michalick, M.S. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*, 137, 159-167.

- De Freitas, J.C., Lopes-Neto, B.E., de Abreu, C.R., Coura-Vital, W., Braga, S.L., Reis, A.B. and Nunes-Pinheiro, D.C. (2012). Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*, 93, 705-709.
- De Lima, H., Rodríguez, N., Barrios, M.A., Avila, A., Cañizales, I. and Gutiérrez, S. (2008). Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103, 412-414.
- De Lima, V.M., Peiro, J.R. and de Oliveira Vasconcelos, R. (2007). IL-6 and TNF-alpha production during active canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 115, 189-193.
- De Lima, V.M., Ikeda, F.A., Rossi, C. N., Feitosa, M.M., Vasconcelos, R. O., Nunes, C. M. and Goto, H. (2010). Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN-gamma levels occur in dogs vaccinated with Leishmune in an endemic area for visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 135, 296-302.
- De Luna, R., Vuotto, M.L., Ielpo, M.T., Ambrosio, R., Piantedosi, D., Moscatiello, V., Ciaramella, P., Scalone, A., Gradoni, L. and Mancino, D. (1999). Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, 70, 95-103.
- De Moraes, R.C., Gonçalves, S.a.C., Costa, P.L., da Silva, K.G., da Silva, F.J., Silva, R.P., de Brito, M.E., Brandão-Filho, S.P., Dantas-Torres, F. and de Paiva-Cavalcanti, M. (2013). Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. *Exp Appl Acarol*, 59, 473-481.
- De Oliveira, C., Teixeira, M., Gomes, R., Barral, A. and Brodskyn, C. (2004). Animal models for infectious diseases caused by parasites: leishmaniasis. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 1, 81-86.
- De Oliveira Mendes, C., Paraguai de Souza, E., Borja-Cabrera, G., Melo Batista, L., Aparecida dos Santos, M., Ellner Parra, L., Menz, I., Palatnik, M. and Palatnik de Sousa, C. (2003). IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. *Vaccine*, 21, 19-20.
- De Paiva Cavalcanti, M., Felinto de Brito, M.E., de Souza, W.V., de Miranda Gomes, Y. and Abath, F.G. (2009). The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *Vet J*, 182, 356-358.
- De Souza, A.I., Juliano, R.S., Gomes, T.S., de Araujo Diniz, S., Borges, A.M., Tafuri, W.L. and Santos, R.L. (2005). Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. *Vet Parasitol*, 129, 51-54.
- De Tommasi, A.S., Otranto, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Breitschwerdt, E.B. and de Caprariis, D. (2013). Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? *Parasit Vectors*, 6, 97.
- De Tommasi, A.S., Otranto, D., Furlanello, T., Tasca, S., Cantacessi, C., Breitschwerdt, E.B., Stanneck, D., Dantas-Torres, F., Baneth, G., Capelli, G. and de Caprariis, D. (2014). Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases. *Parasit Vectors*, 7, 534.
- Denerolle, P. and Bourdoiseau, G. (1999). Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med*, 13, 413-415.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27, 305-318.

- Diniz, S.A., Melo, M.S., Borges, A.M., Bueno, R., Reis, B.P., Tafuri, W.L., Nascimento, E.F. and Santos, R.L. (2005). Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet Pathol*, 42, 650-658.
- Dipineto, L., Manna, L., Baiano, A., Gala, M., Fioretti, A., Gravino, A.E. and Menna, L.F. (2007). Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. *J Wildl Dis*, 43, 518-520.
- Dos-Santos, W.L., Jesus, E.E., Paranhos-Silva, M., Pereira, A.M., Santos, J.C., Baleeiro, C.O., Nascimento, E.G., Moreira, E.D., Oliveira, G.G. and Pontes-de-Carvalho, L.C. (2008). Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Vet Immunol Immunopathol*, 123, 251-259.
- Dougall, A., Shilton, C., Low Choy, J., Alexander, B. and Walton, S. (2009). New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. *Epidemiol Infect*, 137, 1516-1520.
- Dougall, A.M., Alexander, B., Holt, D.C., Harris, T., Sultan, A.H., Bates, P.A., Rose, K. and Walton, S.F. (2011). Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol*, 41, 571-579.
- Dube, A., Sharma, P., Srivastava, J.K., Misra, A., Naik, S. and Katiyar, J.C. (1998). Vaccination of langur monkeys (*Presbytis entellus*) against *Leishmania donovani* with autoclaved *L. major* plus BCG. *Parasitology*, 116 (Pt 3), 219-221.
- Dujardin, J.C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y. and Boelaert, M. (2008). Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*, 14, 1013-1018.
- Dumont, P., Fankhauser, B., Bouhsira, E., Lienard, E., Jacquet, P., Beugnet, F. and Franc, M. (2015). Repellent and insecticidal efficacy of a new combination of fipronil and permethrin against the main vector of canine leishmaniosis in Europe (*Phlebotomus perniciosus*). *Parasit Vectors*, 8, 49.
- Duncan, A.W., Maggi, R.G. and Breitschwerdt, E.B. (2007). *Bartonella* DNA in dog saliva. *Emerg Infect Dis*, 13, 1948-1950.
- Duprey, Z.H., Steurer, F.J., Rooney, J.A., Kirchhoff, L.V., Jackson, J.E., Rowton, E.D. and Schantz, P.M. (2006). Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis*, 12, 440-446.
- Dutcher, J., Young, M., Sherman, J., Hibbits, W. and Walters, D. (1956). Chemical studies on amphotericin B. I. Preparation of the hydrogenation product and isolation of mycosamine, an acetolysis product. *Antibiot Annu*, 866-869.
- Dye, C. (1996). The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg*, 55, 125-130.
- El Baidouri, F., Diancourt, L., Berry, V., Chevenet, F., Pratlong, F., Marty, P. and Ravel, C. (2013). Genetic structure and evolution of the *Leishmania* genus in Africa and Eurasia: what does MLSA tell us. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2255.
- Esch, K.J. and Petersen, C.A. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev*, 26, 58-85.
- Espada, R., Valdespina, S., Alfonso, C., Rivas, G., Ballesteros, M.P. and Torrado, J.J. (2008a). Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int J Pharm*, 361, 64-69.
- Espada, R., Valdespina, S., Dea, M.A., Molero, G., Ballesteros, M.P., Bolás, F. and Torrado, J.J. (2008b). *In vivo* distribution and therapeutic efficacy of a novel

- amphotericin B poly-aggregated formulation. *J Antimicrob Chemother*, 61, 1125-1131.
- Espada, R., Valdespina, S., Molero, G., Dea, M.A., Ballesteros, M.P. and Torrado, J.J. (2008c).** Efficacy of alternative dosing regimens of poly-aggregated amphotericin B. *Int J Antimicrob Agents*, 32, 55-61.
- Farca, A.M., Miniscalco, B., Badino, P., Odore, R., Monticelli, P., Trisciuglio, A. and Ferroglio, E. (2012).** Canine leishmaniosis: in vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. *Parasitol Res*, 110, 2509-2513.
- Fernandes, A.P., Costa, M.M., Coelho, E.A., Michalick, M.S., de Freitas, E., Melo, M.N., Luiz Tafuri, W., Resende, D.e.M., Hermont, V., Abrantes, C.e.F. and Gazzinelli, R.T. (2008).** Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, 26, 5888-5895.
- Fernandes, C.B., Junior, J.T., de Jesus, C., Souza, B.M., Larangeira, D.F., Fraga, D.B., Tavares Veras, P.S. and Barrouin-Melo, S.M. (2014).** Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine*, 32, 1287-1295.
- Fernández-Bellón, H., Solano-Gallego, L., Rodríguez, A., Rutten, V.P., Hoek, A., Ramis, A., Alberola, J. and Ferrer, L. (2005).** Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 107, 163-169.
- Fernández-Bellón, H., Solano-Gallego, L., Bardagí, M., Alberola, J., Ramis, A. and Ferrer, L. (2006).** Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet Parasitol*, 135, 181-185.
- Fernández-Bellón, H., Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Ferrer, L., Gallego, M., Alberola, J. and Ramis, A. (2008).** Little evidence of seasonal variation of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs in Spain. *Vet Parasitol*, 155, 32-36.
- Fernández-Cotrina, J., Iniesta, V., Belinchón-Lorenzo, S., Muñoz-Madrid, R., Serrano, F., Parejo, J.C., Gómez-Gordo, L., Soto, M., Alonso, C. and Gómez-Nieto, L.C. (2013).** Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniosis by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*, 192, 118-128.
- Fernández-Pérez, F.J., Méndez, S., de la Fuente, C., Cuquerella, M., Gómez, M.T. and Alunda, J.M. (1999).** Value of Western blotting in the clinical follow-up of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest*, 11, 170-173.
- Ferreira, C., de Lana, M., Carneiro, M., Reis, A.B., Paes, D.V., da Silva, E.S., Schallig, H. and Gontijo, C.M. (2007).** Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol*, 146, 235-241.
- Ferreira, A., Ituassu, L.T., de Melo, M.N. and de Andrade, A.S. (2008).** Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*, 152, 257-263.
- Ferreira, M.G., Fattori, K.R., Souza, F. and Lima, V.M. (2009).** Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet Parasitol*, 165, 150-154.
- Ferreira, A., Almeida, G.G., Silva, O., Vogas, G.P., Fujiwara, R.T., de Andrade, A.S. and Melo, M.N. (2013).** Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2150.

- Ferrer, L., Juanola, B., Ramos, J.A. and Ramis, A. (1991). Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet Pathol*, 28, 342-343.
- Ferrer, L., Aisa, M.J., Roura, X. and Portús, M. (1995). Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec*, 136, 514-516.
- Ferrer, L. (1999). Clinical aspects of canine leishmaniosis: an update. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum*, 6-10. Hoechst Roussel Vet, Barcelona, Spain.
- Ferrer, L. (2002). The pathology of canine leishmaniasis. En: Killick-Kendrick R ed. *Canine Leishmaniasis: Moving towards a Solution*. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum, 21-24. Sevilla, Spain, Invervet International BV.
- Ferroglio, E., Centaro, E., Mignone, W. and Trisciuglio, A. (2007). Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet Parasitol*, 144, 162-166.
- Ferroglio, E., Poggi, M. and Trisciuglio, A. (2008). Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses Public Health*, 55, 145-148.
- Ferroglio, E., Zanet, S., Mignone, W., Poggi, M., Trisciuglio, A. and Bianciardi, P. (2013). Evaluation of a rapid device for serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs as an alternative to immunofluorescence assay and Western blotting. *Clin Vaccine Immunol*, 20, 657-659.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M. J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J. and Portús, M. (1999). Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol*, 83, 87-97.
- Fisa, R., Riera, C., Gállego, M., Manubens, J. and Portús, M. (2001). Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol*, 99, 105-111.
- Foglia Manzillo, V., Pagano, A., Paciello, O., Di Muccio, T., Gradoni, L. and Oliva, G. (2005). Papular-like glossitis in a dog with leishmaniosis. *Vet Rec*, 156, 213-215.
- Foglia Manzillo, V., Oliva, G., Pagano, A., Manna, L., Maroli, M. and Gradoni, L. (2006). Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Vet Parasitol*, 142, 142-145.
- Foglia Manzillo, V., Paparcone, R., Cappiello, S., De Santo, R., Bianciardi, P. and Oliva, G. (2009). Resolution of tongue lesions caused by *Leishmania infantum* in a dog treated with the association miltefosine-allopurinol. *Parasit Vectors*, 2, Suppl 1, S6.
- Foglia Manzillo, V., Di Muccio, T., Cappiello, S., Scalone, A., Paparcone, R., Fiorentino, E., Gizzarelli, M., Gramiccia, M., Gradoni, L. and Oliva, G. (2013). Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis*, 7, e2225.
- Font, A., Mascort, J., Altimira, J., Closa, J.M. and Vilafranca, M. (2004). Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 45, 199-201.
- Foroughi-Parvar, F. and Hatam, G. (2014). Vaccines for canine leishmaniasis. *Adv Prev Med*, 2014, 569193.

- Fortin, A., Hendrickx, S., Yardley, V., Cos, P., Jansen, H. and Maes, L. (2012). Efficacy and tolerability of oleylphosphocholine (OIPC) in a laboratory model of visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*, 67, 2707-2712.
- Fortin, A., Caridha, D.P., Leed, S., Ngundam, F., Sena, J., Bosschaerts, T., Parriott, S., Hickman, M.R., Hudson, T.H. and Grogil, M. (2014). Direct comparison of the efficacy and safety of oral treatments with oleylphosphocholine (OIPC) and miltefosine in a mouse model of *L. major* cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e3144.
- Franceschi, A., Merildi, V., Guidi, G. and Mancianti, F. (2007). Occurrence of *Leishmania* DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis. *Vet Res Commun*, 31, 335-341.
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A. and Roura, X. (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 137, 214-221.
- Franco, A. O., Davies, C. R., Mylne, A., Dedet, J. P., Gállego, M., Ballart, C., Gramiccia, M., Gradoni, L., Molina, R., Gálvez, R., Morillas-Márquez, F., Barón-López, S., Pires, C. A., Afonso, M. O., Ready, P. D. and Cox, J. (2011). Predicting the distribution of canine leishmaniasis in western Europe based on environmental variables. *Parasitology*, 138, 1878-1891.
- França-Silva, J.C., da Costa, R.T., Siqueira, A.M., Machado-Coelho, G.L., da Costa, C.A., Mayrink, W., Vieira, E.P., Costa, J.S., Genaro, O. and Nascimento, E. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*, 111, 161-173.
- Freitas, J.C., Nunes-Pinheiro, D.C., Lopes Neto, B.E., Santos, G.J., Abreu, C.R., Braga, R.R., Campos, M. and Oliveira, L.F. (2012). Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 45, 24-29.
- Frenais, R., Flochlay-Sigognault, A. and Milon-Harnois, G. (2014). Anti-feeding efficacy of Activyl® Tick Plus topical treatment of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *Parasit Vectors*, 7, 217.
- Gaboriau, F., Chéron, M., Petit, C. and Bolard, J. (1997). Heat-induced superaggregation of amphotericin B reduces its *in vitro* toxicity: a new way to improve its therapeutic index. *Antimicrob Agents Chemother*, 41, 2345-2351.
- Gaglio, G., Brianti, E., Napoli, E., Falsone, L., Dantas-Torres, F., Tarallo, V.D., Otranto, D. and Giannetto, S. (2014). Effect of night time-intervals, height of traps and lunar phases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis. *Acta Trop*, 133C, 73-77.
- García-Alonso, M., Nieto, C.G., Blanco, A., Requena, J.M., Alonso, C. and Navarrete, I. (1996). Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol*, 18, 539-546.
- García-Alonso, M., Blanco, A., Reina, D., Serrano, F.J., Alonso, C. and Nieto, C.G. (1996). Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 18, 617-623.
- Garg, R. and Dube, A. (2006). Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res*, 123, 439-454.
- Gavvani, A.S., Hodjati, M.H., Mohite, H. and Davies, C.R. (2002a). Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet*, 360, 374-379.

- Gavani, A.S., Mohite, H., Edrissian, G.H., Mohebbali, M. and Davies, C.R. (2002b). Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg*, 67, 511-515.
- Geisweid, K., Mueller, R., Sauter-Louis, C. and Hartmann, K. (2012). Prognostic analytes in dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic area. *Vet Rec*, 171, 399.
- Geisweid, K., Weber, K., Sauter-Louis, C. and Hartmann, K. (2013). Evaluation of a conjunctival swab polymerase chain reaction for the detection of *Leishmania infantum* in dogs in a non-endemic area. *Vet J*, 187,192.
- Ginel, P.J., Camacho, S. and Lucena, R. (2008). Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis. *Res Vet Sci*, 85, 510-514.
- Giunchetti, R.C., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B.M., de Oliveira Aguiar-Soares, R.D., de Souza, J.V., das Dores Moreira, N., Malaquias, L.C., Mota e Castro, L.L., de Lana, M. and Reis, A.B. (2007). Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine*, 25, 7674-7686.
- Giunchetti, R.C., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B.M., de Oliveira Aguiar-Soares, R.D., Coura-Vital, W., de Abreu, R.T., Malaquias, L.C., Gontijo, N.F., Brodskyn, C., de Oliveira, C.I., Costa, D.J., de Lana, M. and Reis, A.B. (2008a). A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine*, 26, 623-638.
- Giunchetti, R.C., Martins-Filho, O. ., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Marques, M.J., Tafuri, W.L., Corrêa-Oliveira, R. and Reis, A.B. (2008b). Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 121, 23-33.
- Giunchetti, R.C., Mayrink, W., Carneiro, C.M., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., Marques, M.J., Tafuri, W.L. and Reis, A.B. (2008c). Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*, 84, 269-277.
- Goldstein, R.E., Brovida, C., Fernández-Del Palacio, M.J., Littman, M.P., Polzin, D.J., Zatelli, A., Cowgill, L.D., Iris Glomerular Disease Study Group. (2013). Consensus recommendations for treatment for dogs with serology positive glomerular disease. *J Vet Intern Med*, 27 Suppl 1, S60-6.
- Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M.J., Oliveira, F., Menezes, M.J., Silva, C., de Oliveira, C.I., Miranda, J.C., Elnaiem, D.E., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G. and Brodskyn, C.I. (2008). Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 7845-7850.
- Gomes, R.B., Mendonça, I.L., Silva, V.C., Ruas, J., Silva, M.B., Cruz, M.S., Barral, A. and Costa, C.H. (2007). Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cercopithecus thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 101, 127-133.
- Gomes-Silva, A., Valverde, J.G., Ribeiro-Romão, R.P., Plácido-Pereira, R.M. and DA-Cruz, A.M. (2013). Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection. *Parasitology*, 140, 771-779.

- Gorczyński, R.M. (1985).** Immunization of susceptible BALB/c mice against *Leishmania braziliensis*. I. Resistance induced using as immunogen adherent or nonadherent cells from infected mice. *Cell Immunol*, 94, 1-10.
- Gradoni, L., Maroli, M., Gramiccia, M. and Mancianti, F. (1987).** *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med Vet Entomol*, 1, 339-342.
- Gradoni, L. (2001).** An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol*, 100, 87-103.
- Gradoni, L. (2002).** The diagnosis of canine leishmaniasis. En: Killick-Kendrick R ed. *Canine Leishmaniasis: Moving towards a Solution*. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum, 7-14. Sevilla, Spain, Intervet International BV.
- Gradoni, L., Gramiccia, M. and Scalone, A. (2003).** Visceral leishmaniasis treatment, Italy. *Emerg Infect Dis*, 9, 1617-1620.
- Gradoni, L., Foglia Manzillo, V., Pagano, A., Piantedosi, D., De Luna, R., Gramiccia, M., Scalone, A., Di Muccio, T. and Oliva, G. (2005).** Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*, 23, 5245-5251.
- Gradoni, L. (2015).** Canine *Leishmania* vaccines: still a long way to go. *Vet Parasitol*, 208, 94-100.
- Gramiccia, M., Gradoni, L. and Orsini, S. (1992).** Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann Trop Med Parasitol*, 86, 613-620.
- Gramiccia, M. and Gradoni, L. (2005).** The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol*, 35, 1169-1180.
- Gramiccia, M., Di Muccio, T., Fiorentino, E., Scalone, A., Bongiorno, G., Cappiello, S., Paparcone, R., Manzillo, V. F., Maroli, M., Gradoni, L. and Oliva, G. (2010).** Longitudinal study on the detection of canine *Leishmania* infections by conjunctival swab analysis and correlation with entomological parameters. *Vet Parasitol*, 171, 223-228.
- Gramiccia, M. (2011).** Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol*, 181, 23-30.
- Gray, K.C., Palacios, D.S., Dailey, I., Endo, M.M., Uno, B.E., Wilcock, B.C. and Burke, M.D. (2012).** Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 2234-2239.
- Guarga, J.L., Lucientes, J., Peribáñez, M.A., Molina, R., Gracia, M.J. and Castillo, J.A. (2000a).** Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop*, 77, 203-207.
- Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribáñez, M.A., Alvar, J. and Castillo, J.A. (2000b).** Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res Vet Sci*, 69, 249-253.
- Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribáñez, M.A. and Castillo, J.A. (2002).** Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 88, 13-20.
- Guerra, L.L., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Martins-Filho, O.A., Reis, A.B. and Corrêa-Oliveira, R. (2009).** Evaluation of the influence of tissue parasite density on

- hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*, 104, 611-622.
- Guilford, W. (1996).** Idiopathic inflammatory diseases. En: *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*. (eds. Guilford, W., Center, S., Strombeck, D., Williams, D., and Meyer, D.), 451-486. Philadelphia: WB Saunders.
- Gállego, M., Pratlong, F., Fisa, R., Riera, C., Rioux, J.A., Dedet, J.P. and Portús, M. (2001).** The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* zymodemes in the Old World. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95, 269-271.
- Gálvez, R., Descalzo, M.A., Miró, G., Jiménez, M.I., Martín, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E. and Molina, R. (2010a).** Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop*, 115, 95-102.
- Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M.A., Nieto, J., Dado, D., Martín, O., Cubero, E. and Molina, R. (2010b).** Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol*, 169, 327-334.
- Gómez-Ochoa, P., Castillo, J.A., Gascón, M., Zarate, J.J., Alvarez, F. and Couto, C.G. (2009).** Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet J*, 179, 259-263.
- Gómez-Ochoa, P., Sabate, D., Homedes, J. and Ferrer, L. (2012).** Use of the nitroblue tetrazolium reduction test for the evaluation of domperidone effects on the neutrophilic function of healthy dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 146, 97-99.
- Gómez-Saladín, E., Doud, C.W. and Maroli, M. (2005).** Short report: surveillance of *Leishmania* sp. among sand flies in Sicily (Italy) using a fluorogenic real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 72, 138-141.
- Harizanov, R., Rainova, I., Tzvetkova, N., Kaftandjiev, I., Bikov, I. and Mikov, O. (2013).** Geographical distribution and epidemiological characteristics of visceral leishmaniasis in Bulgaria, 1988 to 2012. *Euro Surveill*, 18, 20531.
- Helhazar, M., Leitão, J., Duarte, A., Tavares, L. and da Fonseca, I.P. (2013).** Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra--Portugal. *Parasit Vectors*, 6, 88.
- Helm, M., Müller, W., Schaarschmidt, D., Grimm, F. and Deplazes, P. (2013).** Allopurinol therapy in imported dogs with leishmaniasis treated outside the endemic area. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 155, 559-567.
- Hernández, L., Llamas, M., Ribas, F., Montoya, A., Checa, R., Sagredo, P., Rupérez, C., Fraile, C., Gálvez, R., Pulido, P., Vázquez, M., Arevalo, F., Punzón, C., Fresno, M. and Miró, G. (2013).** Eficacia clínica y parasitológica de Leishtop® una autovacuna específica en la inmunoterapia de la leishmaniosis canina: resultados preliminares. En: *XXX Congreso Anual de AMVAC*. Madrid.
- Hide, M., Bañuls, A.L. and Tibayrenc, M. (2001).** Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology*, 123, 425-432.
- Hilgard, P., Klenner, T., Stekar, J. and Unger, C. (1993).** Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol*, 32, 90-95.

- Hinterberger-Fischer, M. (2000). Prolactin as pro-inflammatory cytokine--considerations on consolidated immunotherapy after high dosage therapy. *Acta Med Austriaca Suppl*, 52, 16-20.
- Holzmüller, P., Hide, M., Sereno, D. and Lemesre, J.L. (2006). *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. *Infect Genet Evol*, 6, 187-197.
- Hommel, M., Jaffe, C.L., Travi, B. and Milon, G. (1995). Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol*, 89 Suppl 1, 55-73.
- Hotez, P.J. and Gurwith, M. (2011). Europe's neglected infections of poverty. *Int J Infect Dis*, 15, e611-619.
- Howard, J.G., Hale, C. and Liew, F.Y. (1980). Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. III. Nature and significance of specific suppression of cell-mediated immunity in mice highly susceptible to *Leishmania tropica*. *J Exp Med*, 152, 594-607.
- Ikeda-Garcia, F.A., Lopes, R.S., Marques, F.J., de Lima, V.M., Morinishi, C.K., Bonello, F.L., Zanette, M.F., Perri, S.H. and Feitosa, M.M. (2007). Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol*, 143, 254-259.
- IRIS (2013). IRIS Staging of cronic kidney disease (modified 2013) (International Renal Interest Society). <http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.shtml>.
- Jacob, F., Polzin, D.J., Osborne, C.A., Neaton, J.D., Lekcharoensuk, C., Allen, T.A., Kirk, C.A. and Swanson, L.L. (2003). Association between initial systolic blood pressure and risk of developing a uremic crisis or of dying in dogs with chronic renal failure. *J Am Vet Med Assoc*, 222, 322-329.
- Janeway, C.A. and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.
- Jecna, L., Dostalova, A., Wilson, R., Seblova, V., Chang, K.P., Bates, P.A. and Volf, P. (2013). The role of surface glycoconjugates in *Leishmania* midgut attachment examined by competitive binding assays and experimental development in sand flies. *Parasitology*, 140, 1026-1032.
- Jha, S.N., Singh, N.K. and Jha, T.K. (1991). Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. *J Assoc Physicians India*, 39, 314-316.
- José-López, R., la Fuente, C.D. and Añor, S. (2012). Presumed brain infarctions in two dogs with systemic leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 53, 554-557.
- João, A., Pereira, M.A., Cortes, S. and Santos-Gomes, G.M. (2006). Canine leishmaniasis chemotherapy: dog's clinical condition and risk of *Leishmania* transmission. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 53, 540-545.
- Jung, J.W., Kim, D.K., Park, H.W., Oh, K.H., Joo, K.W., Kim, Y.S., Ahn, C., Lee, K.W., Cho, S.H., Min, K.U. and Kang, H.R. (2015). An effective strategy to prevent allopurinol-induced hypersensitivity by HLA typing. *Genet Med*.
- Jusi, M. M., Starke-Buzetti, W. A., Oliveira, T. M., Tenório, M. a. S., Sousa, L. e. O. and Machado, R. Z. (2011). Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, 20, 219-222.
- Jüttner, C., Rodríguez Sánchez, M., Rollán Landeras, E., Slappendel, R.J. and Fragió Arnold, C. (2001). Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. *Vet Rec*, 149, 176-179.

- Kamhawi, S., Modi, G.B., Pimenta, P.F., Rowton, E. and Sacks, D.L. (2000). The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology*, 121 (Pt 1), 25-33.
- Karkamo, V., Kaistinen, A., Näreaho, A., Dillard, K., Vainio-Siukola, K., Vidgrén, G., Tuoresmäki, N. and Anttila, M. (2014). The first report of autochthonous non-vector-borne transmission of canine leishmaniosis in the Nordic countries. *Acta Vet Scand*, 56, 84.
- Kawamura, Y., Yoshikawa, I., Katakura, K. (2010). Imported leishmaniasis in dogs USmilitary bases, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 2017–2019.
- Keenan, C.M., Hendricks, L.D., Lightner, L., Webster, H.K. and Johnson, A.J. (1984). Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet Pathol*, 21, 74-79.
- Ker, H.G., Coura-Vital, W., Aguiar-Soares, R.D., Roatt, B.M., das Dores Moreira, N., Carneiro, C.M., Machado, E.M., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Giunchetti, R.C., Araújo, M.S., Coelho, E.A., da Silveira-Lemos, D. and Reis, A.B. (2013). Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*, 20, 1792-1798.
- Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., Bailly, M., Guy, M.W., Wilkes, T.J., Guy, F.M., Davidson, I., Knechtli, R., Ward, R.D. and Guilvard, E. (1984). Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. *Ann Parasitol Hum Comp*, 59, 555-572.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol*, 4, 1-24.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Pinelli, E., Del Real, G., Molina, R., Vitutia, M.M., Cañavate, M.C. and Nieto, J. (1994). A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite*, 1, 311-318.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Focheux, C., Dereure, J., Puech, M.P. and Cadiergues, M.C. (1997). Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol*, 11, 105-111.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*, 17, 279-289.
- Kimsey, P.B., Theodos, C.M., Mitchen, T.K., Turco, S.J. and Titus, R.G. (1993). An avirulent lipophosphoglycan-deficient *Leishmania major* clone induces CD4+ T cells which protect susceptible BALB/c mice against infection with virulent *L. major*. *Infect Immun*, 61, 5205-5213.
- Kinsky, S.C. (1970). Antibiotic interaction with model membranes. *Annu Rev Pharmacol*, 10, 119-142.
- Koutinas, A.F., Polizopoulou, Z.S., Saridomichelakis, M.N., Argyriadis, D., Fytianou, A. and Plevraki, K.G. (1999). Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc*, 35, 376-383.
- Koutinas, A.F., Saridomichelakis, M.N., Mylonakis, M.E., Leontides, L., Polizopoulou, Z., Billinis, C., Argyriadis, D., Diakou, N. and Papadopoulos, O. (2001). A

- randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 98, 247-261.
- Koutinas, A.F., Carlotti, D.N., Koutinas, C., Papadogiannakis, E.I., Spanakos, G.K. and Saridomichelakis, M.N. (2010).** Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. *Vet Dermatol*, 21, 572-577.
- Koutinas, A.F. and Koutinas, C.K. (2014).** Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Pathol*, 51, 527-538.
- Krieg, A.M. (2002).** CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*, 20, 709-760.
- Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Dereure, J., Lamothe, J., Dedet, J. P. and Bastien, P. (2002a).** Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology*, 125, 197-207.
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J. P. and Bastien, P. (2002b).** Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 40, 210-215.
- Lainson, R. and Shaw, J.J. (1987).** Evolution, classification and geographical distribution. Peters, W. and Killick-Kendrick, R. (Eds.) *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, 1, 1-120.
- Lamothe, J. (2001).** Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 42, 170-175.
- Lamothe, J. and Poujade, A. (2002).** Ulcerative glossitis in a dog with leishmaniasis. *Vet Rec*, 151, 182-183.
- Laniado-Laborín, R. and Cabrales-Vargas, M.N. (2009).** Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol*, 26, 223-227.
- Laskay, T., van Zandbergen, G. and Solbach, W. (2003).** Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*, 11, 210-214.
- Lasri, S., Sahibi, H., Natami, A. and Rhalem, A. (2003).** Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 91, 13-18.
- Laurenti, M.D., Rossi, C.N., Matta, V.L., Tomokane, T.Y., Corbett, C.E., Secundino, N.F., Pimenta, P.F. and Marcondes, M. (2013).** Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet Parasitol*, 196, 296-300.
- Leandro, C., Santos-Gomes, G.M., Campino, L., Romão, P., Cortes, S., Rolão, N., Gomes-Pereira, S., Riça Capela, M.J. and Abranches, P. (2001).** Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol*, 79, 273-284.
- Leite, R.S., Ferreira, S.e.A., Ituassu, L.T., de Melo, M.N. and de Andrade, A.S. (2010).** PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Vet Parasitol*, 170, 201-206.
- Leite, R.S., Mendes, V.C., Ferreira, A.L. and Andrade, A.S. (2011).** The use of conjunctival swab samples for PCR screening for visceral leishmaniasis in vaccinated dogs. *Rev Bras Parasitol Vet*, 20, 36-41.

- Lemesre, J.L., Holzmüller, P., Cavaleira, M., Gonçalves, R.B., Hottin, G. and Papierok, G. (2005). Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine*, 23, 2825-2840.
- Lemesre, J.L., Holzmüller, P., Gonçalves, R.B., Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Cavaleira, M. and Papierok, G. (2007). Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine*, 25, 4223-4234.
- Leontides, L.S., Saridomichelakis, M.N., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A.F., Galatos, A.D. and Mylonakis, M.E. (2002). A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol*, 109, 19-27.
- Leschnik, M., Löwenstein, M., Edelhofer, R. and Kirtz, G. (2008). Imported non-endemic, arthropod-borne and parasitic infectious diseases in Austrian dogs. *Wien Klin Wochenschr*, 120, 59-62.
- Lewis, D.H. and Peters, W. (1977). The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. *Ann Trop Med Parasitol*, 71, 295-312.
- Liew, F.Y., Li, Y., Moss, D., Parkinson, C., Rogers, M.V. and Moncada, S. (1991). Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur J Immunol*, 21, 3009-3014.
- Lima, V.M., Gonçalves, M.E., Ikeda, F.A., Luvizotto, M.C. and Feitosa, M.M. (2003). Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, 36, 485-489.
- Lima, V.M., Fattori, K.R., Michelin, A.e.F., Nogueira, F.o.S. and Souza, L. de O. (2009). Evidence of *Leishmania* spp. antibodies and DNA in bush dogs (*Speothos venaticus*) in Brazil. *J Zoo Wildl Med*, 40, 91-94.
- Lima, W.G., Michalick, M.S., de Melo, M.N. and Luiz Tafuri, W. (2004). Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop*, 92, 43-53.
- Lima, W.G., Oliveira, P.S., Caliari, M.V., Gonçalves, R., Michalick, M.S., Melo, M.N. and Tafuri, W.L. (2007). Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, 117, 129-136.
- Lin, C.H., Chen, J.K., Ko, T.M., Wei, C.Y., Wu, J.Y., Chung, W.H., Chen, S.Y., Liao, Y.D., Hung, S.I. and Chen, Y.T. (2015). Immunologic basis for allopurinol-induced severe cutaneous adverse reactions: HLA-B*58:01-restricted activation of drug-specific T cells and molecular interaction. *J Allergy Clin Immunol*, 135, 1063-1065.
- Liénard, E., Bouhsira, E., Jacquet, P., Warin, S., Kaltsatos, V. and Franc, M. (2013). Efficacy of dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination *spot-on* on dogs against *Phlebotomus perniciosus* and *Ctenocephalides canis*. *Parasitol Res*, 112, 3799-3805.
- Lobsiger, L., Müller, N., Schweizer, T., Frey, C. F., Wiederkehr, D., Zumkehr, B. and Gottstein, B. (2010). An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Vet Parasitol*, 169, 408-414.
- Lombardo, G., Pennisi, M.G., Lupo, T., Migliazzo, A., Caprì, A. and Solano-Gallego, L. (2012). Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Vet Parasitol*, 184, 10-17.

- Lombardo, G., Pennisi, M. G., Lupo, T., Chicharro, C. and Solano-Gallego, L. (2014).** Papular dermatitis due to *Leishmania infantum* infection in seventeen dogs: diagnostic features, extent of the infection and treatment outcome. *Parasit Vectors*, 7, 120.
- Lopez, R., Lucena, R., Novales, M., Ginel, P.J., Martin, E. and Molleda, J. M. (1996).** Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentralbl Veterinarmed B*, 43, 469-474.
- Lorente, C., López, M.M. and Ferrer, L. (2006).** Unusual presentations of cutaneous leishmaniosis. En: *21st Annual Congress of the ESVD-ECVD*, Lisboa.
- Lu, H.G., Zhong, L., Guan, L.R., Qu, J.Q., Hu, X.S., Chai, J.J., Xu, Z.B., Wang, C.T. and Chang, K.P. (1994).** Separation of Chinese *Leishmania* isolates into five genotypes by kinetoplast and chromosomal DNA heterogeneity. *Am J Trop Med Hyg*, 50, 763-770.
- Luciani, A., Sconza, S., Civitella, C. and Guglielmini, C. (2013).** Evaluation of the cardiac toxicity of N-methyl-glucamine antimoniate in dogs with naturally occurring leishmaniasis. *Vet J*, 196, 119-121.
- Lucientes, J., Palmero, J., Guarga, J.L., Gracia, M.J., Peribáñez, M.A., Zárate, J. and Castillo, J.A. (2005).** Risk of transmission of canine leishmaniosis in eastern Spain. *Vet Rec*, 156, 743-744.
- Lukes, J., Mauricio, I.L., Schönián, G., Dujardin, J.C., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Kuhls, K., Tintaya, K.W., Jirků, M., Chocholová, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Oborník, M., Horák, A., Ayala, F.J. and Miles, M.A. (2007).** Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 9375-9380.
- Luppi, M.M., Malta, M C., Silva, T.M., Silva, F.L., Motta, R.O., Miranda, I., Ecco, R. and Santos, R.L. (2008).** Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Vet Parasitol*, 155, 146-151.
- Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D. and Opperdoes, F.R. (2000).** Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, 111, 1-14.
- López-Peña, M., Alemañ, N., Muñoz, F., Fondevila, D., Suárez, M.L., Goicoa, A. and Nieto, J.M. (2009).** Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. *Acta Vet Scand*, 51, 20.
- Madeira M.F., Schubach A.O., Schubach T.M., Pacheco R.S., Oliveira F.S., Pereira S.A., Figueiredo F.B., Baptista C., Marzochi M.C. (2006).** Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100, 442-445.
- Mahshid, M., Baharak, A., Iraj, S., Sina, K., Javad, K. and Mehdi, B. (2014).** Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis in southeast of Iran. *J Parasit Dis*, 38, 218-222.
- Maia, C. and Campino, L. (2008).** Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*, 158, 274-287.
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J.M., Gonçalves, L. and Campino, L. (2009).** Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J*, 179, 142-144.
- Maia, C., Nunes, M., Cristóvão, J. and Campino, L. (2010).** Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Trop*, 116, 193-199.

- Maia, C., Seblova, V., Sadlova, J., Votycka, J. and Volf, P. (2011).** Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. *PLoS Negl Trop Dis*, 5, e1181.
- Maia, C., Nunes, M., Marques, M., Henriques, S., Rolão, N. and Campino, L. (2013).** In vitro drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. *Exp Parasitol*, 135, 36-41.
- Maia, C. and Cardoso, L. (2015).** Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Vet Parasitol*.
- Makni, S., Ayed, K., Ben Said, M. and Ben Rachid, M.S. (1989).** Study of circulating immune complexes during the evolution of visceral Mediterranean leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, 83, 349-355.
- Malta, M.C., Tinoco, H.P., Xavier, M.N., Vieira, A.L., Costa, E.A. and Santos, R.L. (2010).** Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Vet Parasitol*, 169, 193-197.
- Mancianti, F., Falcone, M.L., Giannelli, C. and Poli, A. (1995).** Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 59, 13-21.
- Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L. and Pieri, S. (1988).** Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 82, 566-567.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Morte, R.D., Cringoli, G., Staiano, N. and Gravino, A.E. (2004).** Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 125, 251-262.
- Manna, L., Gravino, A.E., Picillo, E., Decaro, N. and Buonavoglia, C. (2008a).** *Leishmania* DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. *Ann N Y Acad Sci*, 1149, 358-360.
- Manna, L., Reale, S., Picillo, E., Vitale, F. and Gravino, A.E. (2008b).** Interferon-gamma (INF-gamma), IL4 expression levels and *Leishmania* DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol. *Cytokine*, 44, 288-292.
- Manna, L., Reale, S., Picillo, E., Vitale, F. and Gravino, A.E. (2008c).** Urine sampling for real-time polymerase chain reaction based diagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest*, 20, 64-67.
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Picillo, E., Pavone, L.M. and Gravino, A.E. (2008d).** Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*, 177, 279-282.
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F. and Gravino, A.E. (2009).** Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci*, 87, 76-78.
- Manna, L., Paciello, O., Morte, R.D. and Gravino, A.E. (2012).** Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. *Parasit Vectors*, 5, 216.
- Manna, L., Corso, R., Galiero, G., Cerrone, A., Muzj, P. and Gravino, A.E. (2015).** Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasit Vectors*, 8, 289.

- Marcondes, M., Biondo, A.W., Gomes, A.A., Silva, A.R., Vieira, R.F., Camacho, A.A., Quinn, J. and Chandrashekar, R. (2011a).** Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Vet Parasitol*, 175, 15-19.
- Marcondes, M., Ikeda, F.A., Vieira, R.F., Day, M.J., Lima, V. M., Rossi, C.N., Perri, S.H. and Biondo, A.W. (2011b).** Temporal IgG subclasses response in dogs following vaccination against *Leishmania* with Leishmune®. *Vet Parasitol*, 181, 153-159.
- Marcondes, M., de Lima, V.M., de Araújo, M.e.F., Hiramoto, R.M., Tolezano, J.E., Vieira, R.F. and Biondo, A.W. (2013).** Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. *Vet Parasitol*, 197, 649-652.
- Maroli, M., Lavagnino, A., Ansaldi, G. and Cavallini, C. (1990).** Leishmaniasis vectors (Diptera, Psychodidae) in 3 different environments of western Sicily and 2 of the Aeolian Islands. *Parassitologia*, 32, 305-311.
- Maroli, M., Mizzon, V., Siragusa, C., D'Oorazi, A. and Gradoni, L. (2001).** Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med Vet Entomol*, 15, 358-363.
- Maroli, M., Pennisi, M.G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L. and Gramiccia, M. (2007).** Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*, 145, 357-360.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M. and Gradoni, L. (2008).** The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health*, 13, 256-264.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N. and Gradoni, L. (2013).** Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*, 27, 123-147.
- Martin, V., Vouldoukis, I., Moreno, J., McGahie, D., Gueguen, S. and Cuisinier, A.M. (2014).** The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later. *Vet Res*, 45, 69.
- Martinez-Subiela, S., Strauss-Ayali, D., Cerón, J.J. and Baneth, G. (2011).** Acute phase protein response in experimental canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 180, 197-202.
- Martín-Sánchez, J., Guilvard, E., Acedo-Sánchez, C., Wolf-Echeverri, M., Sanchiz-Marín, M.C. and Morillas-Márquez, F. (1994).** *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (southern Spain). *Int J Parasitol*, 24, 405-408.
- Martín-Sánchez, J., Gállego, M., Barón, S., Castillejo, S. and Morillas-Marquez, F. (2006).** Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100, 527-532.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O. and Morillas-Márquez, F. (2007).** Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol*, 145, 267-273.
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V. and Morillas-Márquez, F. (2009).** Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerg Infect Dis*, 15, 795-798.

- Martínez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O. and Altet, L. (2011).** Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasit Vectors*, 4, 57.
- Martínez-Moreno, A., Moreno, T., Martínez-Moreno, F.J., Acosta, I. and Hernández, S. (1995).** Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 48, 209-220.
- Martínez-Ortega, E. (1986).** Biology of Iberian sandflies (Diptera, Psychodidae) under natural conditions. *Ann Ist Super Sanita*, 22, 73-78.
- Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L. and Dumon, H. (2004).** Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol*, 42, 5249-5255.
- Mateo, M., Maynard, L., Vischer, C., Bianciardi, P. and Miró, G. (2009).** Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. *Parasitol Res*, 105, 155-162.
- Matera, L. and Mori, M. (2000).** Cooperation of pituitary hormone prolactin with interleukin-2 and interleukin-12 on production of interferon-gamma by natural killer and T cells. *Ann N Y Acad Sci*, 917, 505-513.
- Mayrink, W., Genaro, O., Silva, J.C., da Costa, R.T., Tafuri, W.L., Toledo, V.P., da Silva, A.R., Reis, A.B., Williams, P. and da Costa, P.W. (1996).** Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91, 695-697.
- McCall, L.I., Zhang, W.W., Ranasinghe, S. and Matlashewski, G. (2013).** Leishmanization revisited: immunization with a naturally attenuated cutaneous *Leishmania donovani* isolate from Sri Lanka protects against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 31, 1420-1425.
- Mekuzas, Y., Gradoni, L., Oliva, G., Foglia Manzillo, V. and Baneth, G. (2009).** *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2, 30-31.
- Mencke, N., Volf, P., Volfova, V. and Stanneck, D. (2003).** Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitol Res*, 90 Suppl 3, S108-111.
- Mencke, N. (2011).** The importance of canine leishmaniosis in non-endemic areas, with special emphasis on the situation in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 124, 434-442.
- Menn, B., Lorentz, S. and Naucke, T.J. (2010).** Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors*, 3, 34.
- Meredith, S.E., Kroon, N.C., Sondorp, E., Seaman, J., Goris, M.G., van Ingen, C.W., Oosting, H., Schoone, G.J., Terpstra, W.J. and Oskam, L. (1995).** Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 33, 1742-1745.
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H. and Deplazes, P. (2005).** Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol*, 43, 5515-5519.
- Michalsky, E.M., Rocha, M.F., da Rocha Lima, A.C., França-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, A.J., Fortes-Dias, C.L. and Dias, E.S. (2007).** Infectivity of seropositive dogs, showing different

- clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol*, 147, 67-76.
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N. and Ferroglia, E. (2011).** An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transbound Emerg Dis*, 58, 352-357.
- Millán, J., Ferroglia, E. and Solano-Gallego, L. (2014).** Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitol Res*, 113, 2005-2014.
- Mir, F., Fontaine, E., Reyes-Gomez, E., Carlus, M. and Fontbonne, A. (2012).** Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. *J Small Anim Pract*, 53, 419-422.
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L. and Ramis, A. (2008).** Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniasis diseased dogs. *Res Vet Sci*, 85, 35-38.
- Miró, G., y Molina, R. (2006).** Leishmaniosis canina: Manejo clínico y situación actual en España. Bayer HealthCare Edition. 114 p.
- Miró, G., Gálvez, R., Mateo, M., Montoya, A., Descalzo, M.A. and Molina, R. (2007a).** Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet Parasitol*, 143, 375-379.
- Miró, G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., García, S., García, A., Caballero, M.J. and Molina, R. (2007b).** A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Parasitol Res*, 101, 253-257.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G. and Baneth, G. (2008).** Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol*, 24, 371-377.
- Miró, G., Oliva, G., Cruz, I., Cañavate, C., Mortarino, M., Vischer, C. and Bianciardi, P. (2009).** Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol*, 20, 397-404.
- Miró, G., Gálvez, R., Fraile, C., Descalzo, M.A. and Molina, R. (2011a).** Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasit Vectors*, 4, 52.
- Miró, G., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., Vázquez, M.V., Benito, M., Villagrasa, M., Brianti, E. and Otranto, D. (2011b).** *Thelazia callipaeda*: infection in dogs: a new parasite for Spain. *Parasit Vectors*, 4, 148.
- Miró, G., Checa, R., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D. and Gálvez, R. (2012).** Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasit Vectors*, 5, 60.
- Miró, G. (2013).** Tratamiento y pronóstico. En: *Leishmaniosis. Una revisión actualizada* (ed. Servet), 8,151-164.
- Miró, G., Montoya, A., Roura, X., Gálvez, R. and Sainz, A. (2013).** Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasit Vectors*, 6, 117.
- Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., Hernández, L., García, M., Canorea, I., Marino, V. and Montoya, A. (2014).** Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasit Vectors*, 7, 112.

- Mishra, M., Biswas, U.K., Jha, D.N. and Khan, A.B. (1992). Amphotericin versus pentamidine in antimony-unresponsive kala-azar. *Lancet*, 340, 1256-1257.
- Mitchell, G.F., Handman, E. and Spithill, T.W. (1984). Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of *Leishmania major* and importance of route of injection. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 62 (Pt 2), 145-153.
- Mohamed-Ahmed, A.H., Les, K.A., Seifert, K., Croft, S.L. and Brocchini, S. (2013). Noncovalent complexation of amphotericin-B with Poly(α -glutamic acid). *Mol Pharm*, 10, 940-950.
- Mohapatra, S. (2014). Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Trop Parasitol*, 4, 4-9.
- Mohebbali, M., Khamesipour, A., Mobedi, I., Zarei, Z. and Hashemi-Fesharki, R. (2004). Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. *Vaccine*, 22, 4097-4100.
- Mohebbali, M., Hajjaran, H., Hamzavi, Y., Mobedi, I., Arshi, S., Zarei, Z., Akhoundi, B., Naeini, K.M., Avizeh, R. and Fakhar, M. (2005). Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol*, 129, 243-251.
- Molano, I., Alonso, M.G., Mirón, C., Redondo, E., Requena, J.M., Soto, M., Nieto, C.G. and Alonso, C. (2003). A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, 92, 1-13.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J. and Alvar, J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88, 491-493.
- Molina, R., Lohse, J. M. and Nieto, J. (2001). Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. *Vet Ther*, 2, 261-267.
- Molina, R., Gradoni, L. and Alvar, J. (2003). HIV and the transmission of *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*, 97 Suppl 1, 29-45.
- Molina, R., Miró, G., Gálvez, R., Nieto, J. and Descalzo, M.A. (2006). Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *Vet Rec*, 159, 206-209.
- Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevilano, O., Melero, S. and Bernal, J. (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol*, 190, 268-271.
- Moll, H. (2000). The role of dendritic cells at the early stages of *Leishmania* infection. *Adv Exp Med Biol*, 479, 163-173.
- Molleda, J., Novales, M., Ginel, P., Fernández, A. and López, R. (1993). Clinical and histopathological study of the eye in canine leishmaniasis. *Israel J Vet Med*, 48, 173-178.
- Molyneux, D. and Killick-Kendrick, R. (1987). The leishmaniasis in biology and medicine. W. Peters and R. Killick-Kendrick (eds). Academic Press: London, 1, 121-176.
- Moraes-Silva, E., Antunes, F.R., Rodrigues, M.S., da Silva Julião, F., Dias-Lima, A.G., Lemos-de-Sousa, V., de Alcantara, A.C., Reis, E.A., Nakatani, M., Badaró, R., Reis, M. G., Pontes-de-Carvalho, L. and Franke, C. R. (2006). Domestic swine in a visceral

- leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. infantum* infection. *Acta Trop*, 98, 176-182.
- Moreira, M.A., Luvizotto, M.C., Garcia, J.F., Corbett, C.E. and Laurenti, M.D. (2007).** Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol*, 145, 245-252.
- Moreno, J., Nieto, J., Chamizo, C., González, F., Blanco, F., Barker, D.C. and Alva, J. (1999).** The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol*, 71, 181-195.
- Moreno, J. and Alvar, J. (2002).** Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*, 18, 399-405.
- Moreno, J., Vouldoukis, I., Martin, V., McGahie, D., Cuisinier, A.M. and Gueguen, S. (2012).** Use of a LiESP/QA-21 vaccine (Canileish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1683.
- Moreno, I., Álvarez, J., García, N., de la Fuente, S., Martínez, I., Marino, E., Toraño, A., Goyache, J., Vilas, F., Domínguez, L. and Domínguez, M. (2014a).** Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Vet Parasitol*, 199, 264-267.
- Moreno, J., Vouldoukis, I., Schreiber, P., Martin, V., McGahie, D., Gueguen, S. and Cuisinier, A.M. (2014b).** Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (Canileish) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. *Vet Immunol Immunopathol*, 158, 199-207.
- Moreno, P. (1999).** Evaluation of secondary haemostasis in canine leishmaniasis. *Vet Rec*, 144, 169-171.
- Moritz, A., Steuber, S. and Greiner, M. (1998).** Clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniasis. *Tokai J Exp Clin Med*, 23, 279-283.
- Morrison, A.C., Ferro, C., Pardo, R., Torres, M., Wilson, M. L. and Tesh, R.B. (1995).** Nocturnal activity patterns of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol*, 32, 605-617.
- Mozos, E., Pérez, J., Day, M.J., Lucena, R. and Ginel, P.J. (1999).** Leishmaniosis and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathological and immunohistochemical study. *J Comp Pathol*, 120, 257-268.
- Muniz-Junqueira, M.I. and de Paula-Coelho, V.N. (2008).** Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, *in vitro*. *Int Immunopharmacol*, 8, 1633-1638.
- Munstermann, L. (2005).** Phlebotomine Sand Flies, the Psychodidae. In: Marquardt, W.C. (Ed.) *Biology of disease vectors*. Dana Dreibelbis, San Diego, California, USA, 141-151. San Diego, California, USA.
- Murray, H.W. (2001).** Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol*, 82, 249-267.
- Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrino, J., Parejo, J.C., Serrano, F.J., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A. and Gómez-Nieto, L.C. (2013).** First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Trop*, 128, 706-709.

- Mylonakis, M.E., Papaioannou, N., Saridomichelakis, M.N., Koutinas, A.F., Billinis, C. and Kontos, V.I. (2005).** Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Clin Pathol*, 34, 243-247.
- Müller, K., van Zandbergen, G., Hansen, B., Laufs, H., Jahnke, N., Solbach, W. and Laskay, T. (2001).** Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol*, 190, 73-76.
- Naranjo, C., Fondevila, D., Leiva, M., Roura, X. and Peña, T. (2005).** Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 133, 37-47.
- Naucke, T.J., Menn, B., Massberg, D. and Lorentz, S. (2008).** Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res*, 103 Suppl 1, S65-68.
- Naucke, T.J. and Lorentz, S. (2012).** First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors*, 5, 67.
- Navarro, J.A., Sánchez, J., Peñafiel-Verdú, C., Buendía, A.J., Altimira, J. and Vilafranca, M. (2010).** Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. *J Comp Pathol*, 143, 297-302.
- Nawaratna, S.S., Weilgama, D.J. and Rajapaksha, K. (2009).** Cutaneous leishmaniasis in Sri Lanka: a study of possible animal reservoirs. *Int J Infect Dis*, 13, 513-517.
- Nieto, C.G., Navarrete, I., Habela, M.A., Serrano, F. and Redondo, E. (1992).** Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, 45, 33-47.
- Noazin, S., Modabber, F., Khamesipour, A., Smith, P. G., Moulton, L.H., Nasser, K., Sharifi, I., Khalil, E.A., Bernal, I.D., Antunes, C.M., Kieny, M.P. and Tanner, M. (2008).** First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine*, 26, 6759-6767.
- Nogueira, F.S., Moreira, M.A., Borja-Cabrera, G.P., Santos, F.N., Menz, I., Parra, L.E., Xu, Z., Chu, H.J., Palatnik-de-Sousa, C.B. and Luvizotto, M.C. (2005).** Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*, 23, 4805-4810.
- Noli, C. and Auxilia, S.T. (2005).** Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol*, 16, 213-232.
- Noli, C. and Saridomichelakis, M.N. (2014).** An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet J*, 202, 425-435.
- Norsworthy, N.B., Sun, J., Elnaiem, D., Lanzaro, G. and Soong, L. (2004).** Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infect Immun*, 72, 1240-1247.
- Ntais, P., Sifaki-Pistola, D., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Pratlong, F., Poupalos, G. and Antoniou, M. (2013).** Leishmaniasis in Greece. *Am J Trop Med Hyg*, 89, 906-915.
- Nunes, C.M., Dias, A. K., Gottardi, F.P., De Paula, H.B., De Azevedo, M.A., De Lima, V.M. and Garcia, J.F. (2007).** Polymerase chain reaction evaluation for canine visceral leishmaniasis diagnosis in dog blood samples. *Rev Bras Parasitol Vet*, 16, 5-9.
- Nunes, C.M., Lima, V.M., Paula, H.B., Perri, S.H., Andrade, A.M., Dias, F.E. and Burattini, M.N. (2008).** Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*, 153, 19-23.

- Oliva, G., Gradoni, L., Ciaramella, P., De Luna, R., Cortese, L., Orsini, S., Davidson, R. N. and Persechino, A. (1995).** Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Antimicrob Chemother*, 36, 1013-1019.
- Oliva, G., Gradoni, L., Cortese, L., Orsini, S., Ciaramella, P., Scalone, A., de Luna, R. and Persechino, A. (1998).** Comparative efficacy of meglumine antimoniate and aminosidine sulphate, alone or in combination, in canine leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, 92, 165-171.
- Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T. and Gradoni, L. (2006).** Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol*, 44, 1318-1322.
- Oliva, G., Roura, X., Crotti, A., Maroli, M., Castagnaro, M., Gradoni, L., Lubas, G., Paltrinieri, S., Zatelli, A. and Zini, E. (2010).** Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 236, 1192-1198.
- Oliva, G., Nieto, J., Foglia Manzillo, V., Cappiello, S., Fiorentino, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Moreno, J., Chicharro, C., Carrillo, E., Butaud, T., Guegand, L., Martin, V., Cuisinier, A.M., McGahie, D., Gueguen, S., Cañavate, C. and Gradoni, L. (2014).** A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. *PLoS Negl Trop Dis*, 8, e3213.
- Oliveira, F., Lawyer, P.G., Kamhawi, S. and Valenzuela, J.G. (2008).** Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS Negl Trop Dis*, 2, e226.
- Oliveira, T.M., Pereira, V.F., Benvenga, G.U., Martin, M.F., Benassi, J.C., da Silva, D.T. and Starke-Buzetti, W.A. (2015).** Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. *Rev Bras Parasitol Vet*, 24, 220-222.
- Ordeix i Esteve, L. and Fondati, A. (2013).** Manifestaciones clínicas cutáneas.En: *Leishmaniosis. Una revisión actualizada* (ed. Servet), 69-95.
- Otranto, D., Paradies, P., Sasanelli, M., Leone, N., de Caprariis, D., Chirico, J., Spinelli, R., Capelli, G. and Brandonisio, O. (2005).** Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest*, 17, 32-37.
- Otranto, D., Paradies, P., Lia, R.P., Latrofa, M.S., Testini, G., Cantacessi, C., Mencke, N., Galli, G., Capelli, G. and Stanneck, D. (2007).** Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Vet Parasitol*, 144, 270-278.
- Otranto, D., Paradies, P., de Caprariis, D., Stanneck, D., Testini, G., Grimm, F., Deplazes, P. and Capelli, G. (2009).** Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clin Vaccine Immunol*, 16, 337-343.
- Otranto, D., de Caprariis, D., Lia, R.P., Tarallo, V., Lorusso, V., Testini, G., Dantas-Torres, F., Latrofa, S., Diniz, P.P., Mencke, N., Maggi, R.G., Breitschwerdt, E., Capelli, G. and Stanneck, D. (2010a).** Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study. *Vet Parasitol*, 172, 323-332.

- Otranto, D., Testini, G., Buonavoglia, C., Parisi, A., Brandonisio, O., Circella, E., Dantas-Torres, F. and Camarda, A. (2010b). Experimental and field investigations on the role of birds as hosts of *Leishmania infantum*, with emphasis on the domestic chicken. *Acta Trop*, 113, 80-83.
- Otranto, D., Testini, G., Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Diniz, P.P., de Caprariis, D., Lia, R.P., Mencke, N., Stanneck, D., Capelli, G. and Breitschwerdt, E.B. (2010c). Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. *J Clin Microbiol*, 48, 3316-3324.
- Otranto, D. y Dantas-Torres, F. (2013). The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol*, 29, 339-345.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., de Caprariis, D., Di Paola, G., Tarallo, V.D., Latrofa, M. S., Lia, R.P., Annoscia, G., Breitshwerdt, E.B., Cantacessi, C., Capelli, G. and Stanneck, D. (2013). Prevention of canine leishmaniosis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid/4.5% flumethrin. *PLoS One*, 8, e56374.
- Owens, S.D., Oakley, D.A., Marryott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T.J., Newton, A., Steurer, F., Schantz, P. and Giger, U. (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 219, 1076-1083.
- Paciello, O., Oliva, G., Gradoni, L., Manna, L., Foglia Manzillo, V., Wojcik, S., Trapani, F. and Papparella, S. (2009). Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania Infantum* infection. *Neuromuscul Disord*, 19, 124-130.
- Pagliano, P., Carannante, N., Rossi, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., Faella, F.S. and Gaeta, G.B. (2005). Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. *J Antimicrob Chemother*, 55, 229-233.
- Palacio, J., Liste, F. and Gascón, M. (1995). Urinary protein/creatinine ratio in the evaluation of renal failure in canine leishmaniasis. *Vet Rec*, 137, 567-568.
- Palacios, D.S., Dailey, I., Siebert, D.M., Wilcock, B.C. and Burke, M.D. (2011). Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 6733-6738.
- Palatnik-de-Sousa, C.B. (2008). Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, 26, 1709-1724.
- Palatnik-de-Sousa, C.B. (2012). Vaccines for canine leishmaniasis. *Front Immunol*, 3, 69.
- Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., Crotti, A., Maroli, M., Oliva, G., Roura, X., Zatelli, A., Zini, E. and Canine Leishmaniasis Working Group, Italian Society of Veterinarians of Companion Animals. (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 236, 1184-1191.
- Pandey, K., Pun, S.B. and Pandey, B.D. (2012). Relapse of kala-azar after use of multiple drugs: a case report and brief review of literature. *Indian J Med Microbiol*, 30, 227-229.
- Pangrazio, K.K., Costa, E.A., Amarilla, S.P., Cino, A. G., Silva, T. M., Paixão, T.A., Costa, L.F., Dengues, E.G., Diaz, A.A. and Santos, R.L. (2009). Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet Parasitol*, 165, 327-331.
- Papadogiannakis, E.I., Koutinas, A. F., Saridomichelakis, M.N., Vlemmas, J., Lekkas, S., Karameris, A. and Fytianou, A. (2005). Cellular immunophenotyping of exfoliative

- dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol Immunopathol*, 104, 227-237.
- Papadogiannakis, E., Andritsos, G., Kontos, V., Spanakos, G., Koutis, C. and Velonakis, E. (2010a).** Determination of CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood of dogs with leishmaniosis before and after prolonged allopurinol monotherapy. *Vet J*, 186, 262-263.
- Papadogiannakis, E., Spanakos, G., Kontos, V., Menounos, P.G., Tegos, N. and Vakalis, N. (2010b).** Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoonoses Public Health*, 57, e23-25.
- Papadopoulou, C., Kostoula, A., Dimitriou, D., Panagiou, A., Bobojianni, C. and Antoniadis, G. (2005).** Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *J Infect*, 50, 53-60.
- Paradies, P., Capelli, G., Cafarchia, C., de Caprariis, D., Sasanelli, M. and Otranto, D. (2006).** Incidences of canine leishmaniasis in an endemic area of southern Italy. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 53, 295-298.
- Paradies, P., Sasanelli, M., de Caprariis, D., Testini, G., Traversa, D., Lia, R.P., Dantas-Torres, F. and Otranto, D. (2010).** Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J*, 186, 370-373.
- Paradies, P., Sasanelli, M., Amato, M.E., Greco, B., De Palo, P. and Lubas, G. (2012).** Monitoring the reverse to normal of clinico-pathological findings and the disease free interval time using four different treatment protocols for canine leishmaniosis in an endemic area. *Res Vet Sci*, 93, 843-847.
- Paranhos-Silva, M., Oliveira, G.G., Reis, E.A., de Menezes, R.M., Fernandes, O., Sherlock, I., Gomes, R.B., Pontes-de-Carvalho, L.C. and dos-Santos, W.L. (2003).** A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Vet Parasitol*, 114, 97-111.
- Paris, C., Loiseau, P.M., Bories, C. and Bréard, J. (2004).** Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 852-859.
- Parpaglia, M.L., Vercelli, A., Cocco, R., Zobba, R. and Manunta, M.L. (2007).** Nodular lesions of the tongue in canine leishmaniosis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 54, 414-417.
- Parra, L.E., Borja-Cabrera, G.P., Santos, F.N., Souza, L.O., Palatnik-de-Sousa, C.B. and Menz, I. (2007).** Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*, 25, 2180-2186.
- Paşa, S., Tetik Vardarlı, A., Erol, N., Karakuş, M., Töz, S., Atasoy, A., Balcıoğlu, I.C., Emek Tuna, G., Ermiş, Ö., Ertabaklar, H. and Özbek, Y. (2015).** Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. *Vet Parasitol*, en prensa.
- Paternina-Gómez, M., Díaz-Olmos, Y., Paternina, L.E. and Bejarano, E.E. (2013).** High prevalence of infection with *Leishmania* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) in dogs in northern Colombia. *Biomedica*, 33, 375-382.
- Pennisi, M.G., De Majo, M., Masucci, M., Britti, D., Vitale, F. and Del Maso, R. (2005a).** Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Vet Rec*, 156, 346-349.
- Pennisi, M.G., Reale, S., Giudice, S.L., Masucci, M., Caracappa, S., Vitale, M. and Vitale, F. (2005b).** Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun*, 29 Suppl 2, 301-303.

- Pennisi, M.G. (2015).** Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. *Vet Parasitol*, 208, 35-47.
- Peña, M.T., Roura, X. and Davidson, M.G. (2000).** Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Vet Ophthalmol*, 3, 35-41.
- Pereira, B.A. and Alves, C.R. (2008).** Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol*, 158, 239-255.
- Petanides, T.A., Koutinas, A.F., Mylonakis, M.E., Day, M.J., Saridomichelakis, M.N., Leontides, L.S., Mischke, R., Diniz, P., Breitschwerdt, E.B., Kritsepi, M., Garipidou, V.A., Koutinas, C.K. and Lekkas, S. (2008).** Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med*, 22, 866-872.
- Petersen, C.A. (2009).** Leishmaniasis, an emerging disease found in companion animals in the United States. *Top Companion Anim Med*, 24, 182-188.
- Pierantozzi, M., Roura, X., Paltrinieri, S., Poggi, M. and Zatelli, A. (2013).** Variation of proteinuria in dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate and allopurinol: a retrospective study. *J Am Anim Hosp Assoc*, 49, 231-236.
- Pilatti, M.M., Ferreira, S.A., de Melo, M.N. and de Andrade, A.S. (2009).** Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Res Vet Sci*, 87, 255-257.
- Pimenta, P.F., Dos Santos, M.A. and De Souza, W. (1987).** Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Leishmania mexicana amazonensis* and rat neutrophils and eosinophils. *J Submicrosc Cytol*, 19, 387-395.
- Pimenta, P.F., Saraiva, E.M., Rowton, E., Modi, G.B., Garraway, L.A., Beverley, S.M., Turco, S.J. and Sacks, D.L. (1994).** Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9155-9159.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G. and Ruitenbergh, J. (1994).** Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*, 62, 229-235.
- Pinto, A.J., Figueiredo, M.M., Silva, F.L., Martins, T., Michalick, M.S. and Tafuri, W.L. (2011).** Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Acta Vet Scand*, 53, 67.
- Plevraki, K., Koutinas, A.F., Kaldrymidou, H., Roumpies, N., Papazoglou, L.G., Saridomichelakis, M.N., Savvas, I. and Leondides, L. (2006).** Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med*, 20, 228-233.
- Poepl, W., Obwaller, A.G., Weiler, M., Burgmann, H., Mooseder, G., Lorentz, S., Rauchenwald, F., Aspöck, H., Walochnik, J. and Naucke, T.J. (2013).** Emergence of sandflies (Phlebotominae) in Austria, a Central European country. *Parasitol Res*, 112, 4231-4237.
- Poli, A., Abramo, F., Mancianti, F., Nigro, M., Pieri, S. and Bionda, A. (1991).** Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron*, 57, 444-452.

- Poli, A., Sozzi, S., Guidi, G., Bandinelli, P. and Mancianti, F. (1997).** Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 71, 263-271.
- Poot, J., Rogers, M.E., Bates, P.A. and Vermeulen, A. (2005).** Detailed analysis of an experimental challenge model for *Leishmania infantum* (JPC strain) in dogs. *Vet Parasitol*, 130, 41-53.
- Poot, J., Janssen, L.H., van Kasteren-Westerneng, T.J., van der Heijden-Liefkens, K.H., Schijns, V.E. and Heckerroth, A. (2009).** Vaccination of dogs with six different candidate leishmaniasis vaccines composed of a chimerical recombinant protein containing ribosomal and histone protein epitopes in combination with different adjuvants. *Vaccine*, 27, 4439-4446.
- Porrozzi, R., Santos da Costa, M. V., Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A.L., dos Santos, C.D., Fernandes, A.P., Gazzinelli, R.T., Campos-Neto, A. and Grimaldi, G. (2007).** Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol*, 14, 544-548.
- Pou-Barreto, C., Serafín-Pérez, I., Fernández-Serafín, C., Carretón, E., González-Miguel, J., Montoya-Alonso, J., Simón, F., Valladares, B. and Morchón, R. (2013).** Prevalencia en perros infectados por *Leishmania* en la Isla de Tenerife (Islas Canarias). En: *XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología*, 153, Las Palmas de Gran Canaria.
- Pratlong, F., Dereure, J., Ravel, C., Lami, P., Balard, Y., Serres, G., Lanotte, G., Rioux, J.A. and Dedet, J.P. (2009).** Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. *Trop Med Int Health*, 14, 1071-1085.
- Proverbio, D., Spada, E., Rondolotti, A. and Tranquillo, V. (2005).** First clinical experiences with a feline omega interferon in the treatment of canine leishmaniasis. In: *Worldleish3*, 193, Palermo-Terrasini, Sicily, Italy.
- Quaresma, P.F., Murta, S.M., Ferreira, E.C., da Rocha-Lima, A.C., Xavier, A.A. and Gontijo, C.M. (2009).** Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop*, 111, 289-294.
- Quilez, J., Martínez, V., Woolliams, J.A., Sanchez, A., Pong-Wong, R., Kennedy, L.J., Quinnell, R.J., Ollier, W.E., Roura, X., Ferrer, L., Altet, L. and Francino, O. (2012).** Genetic control of canine leishmaniasis: genome-wide association study and genomic selection analysis. *PLoS One*, 7, e35349.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., Garcez, L. and Dye, C. (1997).** The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology*, 115 (Pt 2), 143-156.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., Garcez, L.M., Kaye, P.M., Shaw, M.A., Dye, C. and Day, M.J. (2003a).** IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 91, 161-168.
- Quinnell, R.J., Kennedy, L.J., Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, L.M., Shaw, M.A., Carter, S.D., Thomson, W. and Ollier, W.E. (2003b).** Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, 55, 23-28.

- Quinnell, R.J., Courtenay, O., Davidson, S., Garcez, L., Lambson, B., Ramos, P., Shaw, J.J., Shaw, M.A. and Dye, C. (2001). Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*, 122, 253-261.
- Quinnell, R.J. and Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136, 1915-1934.
- Rafati, S., Nakhaee, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Darabi, H., Eravani, D., Sanos, S., Kaye, P., Taghikhani, M., Jamshidi, S. and Rad, M.A. (2005). Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine*, 23, 3716-3725.
- Rallis, T., Day, M.J., Saridomichelakis, M.N., Adamama-Moraitou, K.K., Papazoglou, L., Fytianou, A. and Koutinas, A.F. (2005). Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J Comp Pathol*, 132, 145-152.
- Ramiro, M.J., Zárate, J.J., Hanke, T., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J.A. and Larraga, V. (2003). Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, 21, 2474-2484.
- Ramos, I., Alonso, A., Marcen, J.M., Peris, A., Castillo, J.A., Colmenares, M. and Larraga, V. (2008). Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine*, 26, 333-344.
- Ramírez, G.A., Peñafiel-Verdú, C., Altimira, J., García-González, B. and Vilafranca, M. (2013). Naturally acquired visceral leishmaniosis in a captive Bennett's wallaby (*Macropus rufogriseus rufogriseus*). *Vet Pathol*, 50, 188-190.
- Ready, P.D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*, 15, 19505.
- Ready, P.D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*, 6, 147-154.
- Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M.G., Mayrink, W., França-Silva, J.C., Giunchetti, R.C., Genaro, O. and Corrêa-Oliveira, R. (2006a). Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*, 81, 68-75.
- Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Guerra, L.L., Carvalho, M.G., Mayrink, W., Genaro, O., Corrêa-Oliveira, R. and Martins-Filho, O.A. (2006b). Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol*, 146, 303-311.
- Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Vale, A.M., Marques, M.J., Giunchetti, R.C., Mayrink, W., Guerra, L.L., Andrade, R.A., Corrêa-Oliveira, R. and Martins-Filho, O.A. (2006c). Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, 112, 102-116.
- Reithinger, R., Teodoro, U. and Davies, C.R. (2001). Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. *Emerg Infect Dis*, 7, 872-876.
- Reithinger, R., Lambson, B.E., Barker, D.C., Counihan, H., Espinoza, C.J., González, J.S. and Davies, C.R. (2002a). *Leishmania (Viannia)* spp. dissemination and tissue

- tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96, 76-78.
- Reithinger, R., Quinnell, R.J., Alexander, B. and Davies, C.R. (2002b).** Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol*, 40, 2352-2356.
- Reithinger, R., Coleman, P.G., Alexander, B., Vieira, E.P., Assis, G. and Davies, C.R. (2004).** Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int J Parasitol*, 34, 55-62.
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. and Brooker, S. (2007).** Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7, 581-596.
- Rezvan, H. and Moafi, M. (2015).** An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article. *Vet Res Forum*, 6, 1-7.
- Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S. and Jaffe, C.L. (1999).** Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet Immunol Immunopathol*, 71, 69-76.
- Ribeiro, R.R., Moura, E.P., Pimentel, V.M., Sampaio, W.M., Silva, S.M., Schettini, D.A., Alves, C.F., Melo, F.A., Tafuri, W.L., Demicheli, C., Melo, M. N., Frézard, F. and Michalick, M.S. (2008).** Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2564-2572.
- Riera, C. and Valladares, J.E. (1996).** Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitol Today*, 12, 412.
- Riera, C., Valladares, J.E., Gállego, M., Aisa, M.J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrió, J., Alberola, J. and Arboix, M. (1999).** Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol*, 84, 33-47.
- Riera, C., Fisa, R., López-Chejade, P., Serra, T., Girona, E., Jiménez, M., Muncunill, J., Sedeño, M., Mascaró, M., Udina, M., Gállego, M., Carrió, J., Forteza, A. and Portús, M. (2008).** Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion*, 48, 1383-1389.
- Rittig, M.G. and Bogdan, C. (2000).** *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today*, 16, 292-297.
- Rivier, D., Shah, R., Bovay, P. and Mauel, J. (1993).** Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. *Parasite Immunol*, 15, 75-84.
- Roatt, B.M., Aguiar-Soares, R.D., Vitoriano-Souza, J., Coura-Vital, W., Braga, S. L., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., de Lana, M., Figueiredo Gontijo, N., Marques, M.J., Giunchetti, R.C. and Reis, A.B. (2012).** Performance of LBSap vaccine after intradermal challenge with *L. infantum* and saliva of *Lu. longipalpis*: immunogenicity and parasitological evaluation. *PLoS One*, 7, e49780.
- Rodgers, M.R., Popper, S.J. and Wirth, D.F. (1990).** Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol*, 71, 267-275.

- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sánchez-Robert, E., Francino, O. and Alberola, J. (2007a). A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol*, 37, 683-693.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sánchez-Robert, E., Francino, O. and Alberola, J. (2007b). Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine*, 25, 7962-7971.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., Todolí, F. and Alberola, J. (2013). Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs. *Vet Parasitol*, 191, 363-366.
- Rogers, M.E. and Bates, P.A. (2007). *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog*, 3, e91.
- Rolão, N., Martins, M.J., João, A. and Campino, L. (2005). Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, 12, 183-186.
- Romero, G.A. and Boelaert, M. (2010). Control of visceral leishmaniasis in Latin America-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, 4, e584.
- Rose, K., Curtis, J., Baldwin, T., Mathis, A., Kumar, B., Sakthianandeswaren, A., Spurck, T., Low Choy, J. and Handman, E. (2004). Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *Int J Parasitol*, 34, 655-664.
- Rosypal, A.C. and Lindsay, D.S. (2005). Non-sand fly transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected BALB/c mice. *J Parasitol*, 91, 1113-1115.
- Rosypal, A.C., Troy, G.C., Duncan, R.B., Zajac, A.M. and Lindsay, D.S. (2005a). Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum infantum*. *J Vet Intern Med*, 19, 802-809.
- Rosypal, A.C., Troy, G.C., Zajac, A.M., Frank, G. and Lindsay, D.S. (2005b). Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol*, 91, 970-972.
- Rotureau, B., Ravel, C., Aznar, C., Carme, B., Dedet, J.P. (2006). First report of *Leishmania infantum* in French Guiana: canine visceral leishmaniasis imported from the old world. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1120-1122.
- Rougier, S., Vouldoukis, I., Fournel, S., Pérès, S. and Woehrlé, F. (2008). Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniasis: a pilot study. *Vet Parasitol*, 153, 244-254.
- Rougier, S., Hasseine, L., Delaunay, P., Michel, G. and Marty, P. (2012). One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 186, 245-253.
- Roura, X., Fondevila, D., Sánchez, A. and Ferrer, L. (1999). Detection of *Leishmania infection* in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*, 11, 385-387.
- Roura, X., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Maroli, M., Oliva, G., Paltrinieri, S., Zatelli, A. and Zini, E. (2013). Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: a working group report. *Vet J*, 198, 43-47.
- Sabaté, D., Llinás, J., Homedes, J., Sust, M. and Ferrer, L. (2014). A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a

- domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Prev Vet Med*, 115, 56-63.
- Sacchi, L., Calvi, L.E., Kramer, L.H., Ferroglio, E., Grandi, G., Clementi, E. and Corona, S. (2006).** The intradermal Leishmanin reaction induces antigen-specific maturation of canine dendritic cells with up-regulation of MHCII synthesis and expression. *J Comp Pathol*, 135, 17-24.
- Sacks, D. and Kamhawi, S. (2001).** Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*, 55, 453-483.
- Saint- André Marchal, I., Marchal, T., Moore, P. F., Magnol, J.P. and Bourdoiseau, G. (1997).** Infection of canine Langerhans cell and interdigitating dendritic cell by *Leishmania infantum* in spontaneous canine leishmaniasis. *Revue d de Medicine Veterinaire*, 148, 29-36.
- Sanchez, M.A., Diaz, N.L., Zerpa, O., Negron, E., Convit, J. and Tapia, F.J. (2004).** Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*, 70, 618-624.
- Sanchez-Robert, E., Altet, L., Sanchez, A. and Francino, O. (2005).** Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J Hered*, 96, 755-758.
- Sanchez-Robert, E., Altet, L., Utzet-Sadurni, M., Giger, U., Sanchez, A. and Francino, O. (2008).** Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet Res*, 39, 36.
- Sangiorgi, B., Miranda, D.N., Oliveira, D.F., Santos, E.P., Gomes, F.R., Santos, E.O., Barral, A. and Miranda, J.C. (2012).** Natural breeding places for phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae) in a semiarid region of bahia state, Brazil. *J Trop Med*, 2012, 124068.
- Santa-Rita, R.M., Santos Barbosa, H., Meirelles, M.N. and de Castro, S.L. (2000).** Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*, 75, 219-228.
- Santana, C.C., Vassallo, J., de Freitas, L.A., Oliveira, G.G., Pontes-de-Carvalho, L.C. and dos-Santos, W.L. (2008).** Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol*, 30, 515-524.
- Santarém, N., Silvestre, R., Cardoso, L., Schallig, H., Reed, S.G. and Cordeiro-da-Silva, A. (2010).** Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 48, 1866-1874.
- Santiago, M.E., Neto, L.S., Alexandre, E.C., Munari, D.P., Andrade, M.M., Somenzari, M.A., Ciarlini, P.C. and de Lima, V.M. (2013).** Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. *Acta Trop*, 127, 174-180.
- Santos, F.N., Borja-Cabrera, G.P., Miyashiro, L.M., Grechi, J., Reis, A.B., Moreira, M.A., Martins Filho, O.A., Luvizotto, M.C., Menz, I., Pessôa, L.M., Gonçalves, P.R., Palatnik, M. and Palatnik-de-Sousa, C.B. (2007).** Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine*, 25, 6176-6190.
- Santos, M., Marcos, R., Assunção, M. and Matos, A.J. (2006).** Polyarthritis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Vet Parasitol*, 141, 340-344.

- Santos-Gomes, G.M., Campino, L. and Abranches, P. (2000). Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95, 193-198.
- Santos-Gomes, G.M., Rosa, R., Leandro, C., Cortes, S., Romão, P. and Silveira, H. (2002). Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, 88, 21-30.
- Santos-Gomes, G.M., Capela, M.J., Ramada, J. and Campino, L. (2003). Experimental canine leishmaniasis: evolution of infection following re-challenge with *Leishmania infantum*. *Acta Trop*, 87, 235-244.
- Saraiva, E.M., de Figueiredo Barbosa, A., Santos, F. N., Borja-Cabrera, G. P., Nico, D., Souza, L.O., de Oliveira Mendes-Aguiar, C., de Souza, E.P., Fampa, P., Parra, L.E., Menz, I., Dias, J.G., de Oliveira, S.M. and Palatnik-de-Sousa, C.B. (2006). The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine*, 24, 2423-2431.
- Saridomichelakis, M.N. (2009). Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol*, 20, 471-489.
- Saridomichelakis, M.N., Mylonakis, M.E., Leontides, L.S., Koutinas, A.F., Billinis, C. and Kontos, V.I. (2005). Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg*, 73, 82-86.
- Saridomichelakis, M.N. and Koutinas, A.F. (2014). Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet Dermatol*, 25, 61-71, e22.
- Sastre, N., Francino, O., Ramírez, O., Enseñat, C., Sánchez, A. and Altet, L. (2008). Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Vet Parasitol*, 158, 117-120.
- Savani, E.S., Nunes, V.L., Galati, E.A., Castilho, T.M., Zampieri, R.A. and Floeter-Winter, L.M. (2009). The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet Parasitol*, 160, 18-24.
- Savani, E.S., de Almeida, M.F., de Oliveira Camargo, M.C., D'Auria, S.R., Silva, M.M., de Oliveira, M.L. and Sacramento, D. (2010). Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* in Brazilian bats. *Vet Parasitol*, 168, 5-10.
- Savić, S., Vidić, B., Grgić, Z., Potkonjak, A. and Spasojevic, L. (2014). Emerging Vector-Borne Diseases - Incidence through Vectors. *Front Public Health*, 2, 267.
- Schallig, H.D., Schoone, G.J., Beijer, E.G., Kroon, C.C., Hommers, M., Ozbel, Y., Ozensoy, S., da Silva, E.S., Cardoso, L.M. and da Silva, E.D. (2002). Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet Parasitol*, 109, 1-8.
- Schallig, H.D., Cardoso, L., Hommers, M., Kroon, N., Belling, G., Rodrigues, M., Semião-Santos, S.J. and Vetter, H. (2004). Development of a dipstick assay for detection of *Leishmania*-specific canine antibodies. *J Clin Microbiol*, 42, 193-197.
- Schallig, H.D., Cardoso, L. and Semião-Santos, S.J. (2013). Seroepidemiology of canine leishmaniosis in Évora (southern Portugal): 20-year trends. *Parasit Vectors*, 6, 100.
- Schneider, M., Thomas, V., Boisrame, B. and Deleforge, J. (1996). Pharmacokinetics of marbofloxacin in dogs after oral and parenteral administration. *J Vet Pharmacol Ther*, 19, 56-61.

- Seblova, V., Oury, B., Eddaikra, N., Aït-Oudhia, K., Pratlong, F., Gazanion, E., Maia, C., Volf, P. and Sereno, D. (2014). Transmission potential of antimony-resistant *Leishmania* field isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 6273-6276.
- Sereno, D., Maia, C. and Aït-Oudhia, K. (2012). Antimony resistance and environment: Elusive links to explore during *Leishmania* life cycle. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2, 200-203.
- Serrano, D.R., Hernández, L., Fleire, L., González-Alvarez, I., Montoya, A., Ballesteros, M.P., Dea-Ayuela, M.A., Miró, G., Bolás-Fernández, F. and Torrado, J.J. (2013). Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *Int J Pharm*, 447, 38-46.
- Shakya, N., Bajpai, P. and Gupta, S. (2011). Therapeutic switching in *Leishmania* chemotherapy: a distinct approach towards unsatisfied treatment needs. *J Parasit Dis*, 35, 104-112.
- Sharma, N.L., Mahajan, V.K., Negi, A.K. and Verma, G.K. (2009). The rK39 immunochromatic dipstick testing: a study for K39 seroprevalence in dogs and human leishmaniasis patients for possible animal reservoir of cutaneous and visceral leishmaniasis in endemic focus of Satluj river valley of Himachal Pradesh (India). *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 75, 52-55.
- Sharma, U. and Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*, 45, 255-272.
- Sharma, U. and Singh, S. (2009). Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol*, 47, 412-423.
- Shaw, S.E., Langton, D.A. and Hillman, T.J. (2009). Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? *Vet Parasitol*, 163, 281-285.
- Shio, M.T., Paquet, M., Martel, C., Bosschaerts, T., Stienstra, S., Olivier, M. and Fortin, A. (2014). Drug delivery by tattooing to treat cutaneous leishmaniasis. *Sci Rep*, 4, 4156.
- Silaghi, C., Knaus, M., Rapti, D., Kusi, I., Shukullari, E., Hamel, D., Pfister, K. and Rehbein, S. (2014). Survey of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*, haemotropic mycoplasmas and other arthropod-borne pathogens in cats from Albania. *Parasit Vectors*, 7, 62.
- Silva, D.A., Madeira, M.F., Teixeira, A.C., de Souza, C.M. and Figueiredo, F.B. (2011). Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol*, 179, 257-261.
- Silva, F., Gomes, R., Prates, D., Miranda, J.C., Andrade, B., Barral-Netto, M. and Barral, A. (2005). Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am J Trop Med Hyg*, 72, 94-98.
- Silva, F.L., Rodrigues, A.A., Rego, I.O., Santos, R.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M., Xavier, M.N. and Nascimento, E.F. (2008). Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol*, 151, 86-90.
- Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M., Xavier, M.N., Nascimento, E.F. and Santos, R.L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 160, 55-59.
- Silvestre, R., Cordeiro-da-Silva, A. and Ouassii, A. (2008). Live attenuated *Leishmania* vaccines: a potential strategic alternative. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 56, 123-126.

- Sindermann, H. and Engel, J. (2006). Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100 Suppl 1, S17-20.
- Singh, R.K., Pandey, H.P. and Sundar, S. (2006). Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *Indian J Med Res*, 123, 331-344.
- Slama, D., Haouas, N., Remadi, L., Mezhoud, H., Babba, H. and Chaker, E. (2014). First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasit Vectors*, 7, 51.
- Slappendel, R.J. (1988). Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q*, 10, 1-16.
- Slappendel, R.J. and Teske, E. (1997). The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. *Vet Q*, 19, 10-13.
- Sobrinho, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M.C., Triscioglio, A. and Gortázar, C. (2008). Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol*, 155, 198-203.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J. and Ferrer, L. (2000). The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, 90, 37-45.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J. and Ferrer, L. (2001a). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*, 39, 560-563.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Arboix, M., Ferrer, L. and Alberola, J. (2001b). Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. *Vet Parasitol*, 102, 163-166.
- Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, J.E., Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M. and Portús, M. (2001c). *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol*, 96, 265-276.
- Solano-Gallego, L., Fernández-Bellon, H., Serra, R., Gállego, M., Ramis, A., Fondevila, D. and Ferrer, L. (2003a). Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equine Vet J*, 35, 320-323.
- Solano-Gallego, L., Rodríguez, A., Iniesta, L., Arboix, M., Portús, M. and Alberola, J. (2003b). Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10, 849-855.
- Solano-Gallego, L., Fernández-Bellon, H., Morell, P., Fondevila, D., Alberola, J., Ramis, A. and Ferrer, L. (2004). Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol*, 130, 7-12.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramis, A., Fernández-Bellon, H., Rodríguez, A., Ferrer, L. and Alberola, J. (2005). Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test. *Am J Trop Med Hyg*, 72, 815-818.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B. and Breitschwerdt, E. (2006). A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet Res*, 37, 231-244.
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortes, A., Trotta, M., Zampieron, C., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M., Roura, X. and Alberola, J. (2007a). Detection of

- Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 147, 315-319.
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M. and Alberola, J. (2007b).** Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniosis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg*, 76, 676-680.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. and Baneth, G. (2009).** Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 165, 1-18.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. and The LeishVet Group (2011).** LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*, 4, 86.
- Solano-Gallego, L., Kyriacou, C., Yasur, D., Villanueva-Saz, S., Eyal, O. and Baneth, G. (2013).** A cross-sectional study on *Leishmania infantum* infection by serology and non-invasive PCR in sick and clinically healthy dogs from Cyprus. En: 8th CVBD World Forum pp. 42. St. Petersburg.
- Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T. and Natale, A. (2014).** Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and Leishmania 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. *Parasit Vectors*, 7, 111.
- Solcà, M.S., Bastos, L.A., Guedes, C.E., Bordoni, M., Borja, L.S., Larangeira, D.F., da Silva Estrela Tuy, P.G., Amorim, L.D., Nascimento, E.G., de Sá Oliveira, G.G., dos-Santos, W.L., Fraga, D.B. and Veras, P.S. (2014).** Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. *PLoS One*, 9, e103635.
- Soto, J., Toledo, J., Valda, L., Balderrama, M., Rea, I., Parra, R., Ardiles, J., Soto, P., Gomez, A., Molleda, F., Fuentelsaz, C., Anders, G., Sindermann, H., Engel, J. and Berman, J. (2007).** Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin Infect Dis*, 44, 350-356.
- Soto, M., Requena, J.M., Quijada, L. and Alonso, C. (1998).** Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 36, 58-63.
- Souza, N.P., Almeida, A.B., Freitas, T.P., Paz, R.C., Dutra, V., Nakazato, L. and Sousa, V.R. (2010).** *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in wild canids kept in captivity in the State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop*, 43, 333-335.
- Souza, T.D., Turchetti, A.P., Fujiwara, R.T., Paixão, T.A. and Santos, R.L. (2014).** Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. *Vet Parasitol*, 200, 233-241.
- Stanneck, D., Ebbinghaus-Kintscher, U., Schoenhense, E., Kruedewagen, E.M., Turberg, A., Leisewitz, A., Jiritschka, W. and Krieger, K.J. (2012a).** The synergistic action of imidacloprid and flumethrin and their release kinetics from collars applied for ectoparasite control in dogs and cats. *Parasit Vectors*, 5, 73.
- Stanneck, D., Rass, J., Radeloff, I., Kruedewagen, E., Le Sueur, C., Hellmann, K. and Krieger, K. (2012b).** Evaluation of the long-term efficacy and safety of an imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar (Seresto®) in dogs and cats naturally infested with fleas and/or ticks in multicentre clinical field studies in Europe. *Parasit Vectors*, 5, 66.

- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L. and Baneth, G. (2004). Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis*, 189, 1729-1733.
- Strauss-Ayali, D., Baneth, G. and Jaffe, C.L. (2007). Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet Res*, 38, 547-564.
- Sundar, S., Rosenkaimer, F., Makharia, M.K., Goyal, A.K., Mandal, A.K., Voss, A., Hilgard, P. and Murray, H.W. (1998). Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet*, 352, 1821-1823.
- Sundar, S. and Rai, M. (2002). Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*, 15, 593-598.
- Sundar, S. and Chatterjee, M. (2006). Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res*, 123, 345-352.
- Sundar, S., Chakravarty, J., Agarwal, D., Rai, M. and Murray, H.W. (2010). Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med*, 362, 504-512.
- Sundar, S., Sinha, P.K., Rai, M., Verma, D.K., Nawin, K., Alam, S., Chakravarty, J., Vaillant, M., Verma, N., Pandey, K., Kumari, P., Lal, C.S., Arora, R., Sharma, B., Ellis, S., Strub-Wourgaft, N., Balasegaram, M., Olliaro, P., Das, P. and Modabber, F. (2011). Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet*, 377, 477-486.
- Suárez, B., Isidoro, B., Santos, S., Sierra, M. J., Molina, R., Astray, J. and Amela, C. (2012). Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev Esp Salud Pública*, 6, 555-564.
- Sánchez-Brunete, J.A., Dea, M.A., Rama, S., Bolás, F., Alunda, J.M., Raposo, R., Méndez, M.T., Torrado-Santiago, S. and Torrado, J.J. (2004). Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 3246-3252.
- Tabar, M.D., Roura, X., Francino, O., Altet, L. and Ruiz de Gopegui, R. (2008). Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *J Small Anim Pract*, 49, 325-328.
- Tafari, W.L., de Oliveira, M.R. and Melo, M.N. (2001). Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol*, 96, 203-212.
- Tánczos, B., Balogh, N., Király, L., Biksi, I., Szeredi, L., Gyurkovsky, M., Scalone, A., Fiorentino, E., Gramiccia, M. and Farkas, R. (2012). First record of autochthonous canine leishmaniasis in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12, 588-594.
- Tarallo, V.D., Dantas-Torres, F., Lia, R.P. and Otranto, D. (2010). Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy. *Acta Trop*, 116, 227-234.
- Tassi, P., Ormas, P., Madonna, M., Carli, S., Belloli, C., De Natale, G., Ceci, L. and Marcotrigiano, G.O. (1994). Pharmacokinetics of N-methylglucamine antimoniate after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in the dog. *Res Vet Sci*, 56, 144-150.
- Teixeira, M.J., Teixeira, C.R., Andrade, B.B., Barral-Netto, M. and Barral, A. (2006). Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 22, 32-40.

- Teixeira Neto, R.G., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Vitor, R.W., Coura-Vital, W., Quaresma, P.F., Ker, H.G., de Melo, L.A., Gontijo, C.M. and Reis, A.B. (2010). Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 169, 248-257.
- Tellevis, M.G., Muller, K. E., Løkken, K.R. and Nerland, A. H. (2014). Detection of a broad range of *Leishmania* species and determination of parasite load of infected mouse by real-time PCR targeting the arginine permease gene AAP3. *Acta Trop*, 137, 99-104.
- Todoí, F., Solano-Gallego, L., Ojeda, A., Quintana, J., Lloret, A., Roura, X., Alberola, J. and Rodríguez-Cortés, A. (2009). Anti-*Leishmania* IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 159, 17-23.
- Tolezano, J.E., Uliana, S.R., Taniguchi, H.H., Araújo, M. F., Barbosa, J.A., Barbosa, J.E., Floeter-Winter, L.M. and Shaw, J.J. (2007). The first records of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*, 149, 280-284.
- Torrent, E., Leiva, M., Segalés, J., Franch, J., Peña, T., Cabrera, B. and Pastor, J. (2005). Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. *J Small Anim Pract*, 46, 549-552.
- Torres, M., Bardagí, M., Roura, X., Zanna, G., Ravera, I. and Ferrer, L. (2011). Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*, 188, 346-351.
- Travi, B.L., Tabares, C.J., Cadena, H., Ferro, C. and Osorio, Y. (2001). Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg*, 64, 119-124.
- Travi, B.L., Osorio, E.Y., Saldarriaga, O.A., Cadena, H., Tabares, C.J., Peniche, A., Lee, S. and Melby, P.C. (2009). Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived *Leishmania chagasi* promastigotes. *Am J Trop Med Hyg*, 81, 994-1003.
- Trigo, J., Abbehusen, M., Netto, E.M., Nakatani, M., Pedral-Sampaio, G., de Jesus, R.S., Goto, Y., Guderian, J., Howard, R.F. and Reed, S.G. (2010). Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f+MPL-SE. *Vaccine*, 28, 3333-3340.
- Tuon, F.F., Amato, V.S., Bacha, H.A., Almusawi, T., Duarte, M.I. and Amato Neto, V. (2008). Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun*, 76, 866-872.
- Turchetti, A.P., Souza, T.D., Paixão, T.A. and Santos, R.L. (2014). Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*, 8, 403-407.
- Valladares, J.E., Alberola, J., Esteban, M. and Arboix, M. (1996). Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Vet Rec*, 138, 181-183.
- Valladares, J.E., Riera, C., Alberola, J., Gállego, M., Portús, M., Cristòfol, C., Franquelo, C. and Arboix, M. (1998). Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*, 75, 33-40.
- Valladares, J.E., Riera, C., González-Ensenyat, P., Díez-Cascón, A., Ramos, G., Solano-Gallego, L., Gállego, M., Portús, M., Arboix, M. and Alberola, J. (2001). Long term improvement in the treatment of canine leishmaniosis using an antimony liposomal formulation. *Vet Parasitol*, 97, 15-21.

- Vamvakidis, C.D., Koutinas, A.F., Kanakoudis, G., Georgiadis, G. and Saridomichelakis, M. (2000). Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Rec*, 146, 698-703.
- Van Etten, E.W., van Vianen, W., Roovers, P. and Frederik, P. (2000). Mild heating of amphotericin B-desoxycholate: effects on ultrastructure, in vitro activity and toxicity, and therapeutic efficacy in severe candidiasis in leukopenic mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 1598-1603.
- Van Eys, G.J., Schoone, G.J., Kroon, N. C. and Ebeling, S.B. (1992). Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 51, 133-142.
- Van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W. and Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*, 173, 6521-6525.
- Vercammen, F., Fernandez-Perez, F.J., del Amo, C. and Alunda, J.M. (2002). Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Trop*, 84, 175-181.
- Vergel, C., Palacios, R., Cadena, H., Posso, C.J., Valderrama, L., Perez, M., Walker, J., Travi, B.L. and Saravia, N.G. (2006). Evidence for *Leishmania (viannia)* parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. *J Infect Dis*, 194, 503-511.
- Verçosa, B.L., Lemos, C.M., Mendonça, I.L., Silva, S.M., de Carvalho, S.M., Goto, H. and Costa, F.A. (2008). Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet Res*, 4, 45.
- Verçosa, B.L., Melo, M.N., Puerto, H.L., Mendonça, I.L. and Vasconcelos, A.C. (2012). Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. *Vet Parasitol*, 189, 162-170.
- Vexenat, J.A., de Castro, J.A., Cavalcante, R., Tavares, J.P., da Silva, M.R., Batista, W.H., Campos, J.H., Howard, M.K., Frame, I. and McNerney, R. (1994). Visceral leishmaniasis in Teresina, State of Piauí, Brazil: preliminary observations on the detection and transmissibility of canine and sandfly infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 89, 131-135.
- Vexenat, J.A., Oliaro, P.L., Fonseca de Castro, J.A., Cavalcante, R., Furtado Campos, J.H., Tavares, J.P. and Miles, M.A. (1998). Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidine (paromomycin). *Am J Trop Med Hyg*, 58, 448-453.
- Viegas, C., Requicha, J., Albuquerque, C., Sargo, T., Machado, J., Dias, I., Pires, M.A., Campino, L. and Cardoso, L. (2012). Tongue nodules in canine leishmaniasis--a case report. *Parasit Vectors*, 5, 120.
- Vilas, F., Carpintero, J., Sevilla, S., Martínez, A., Ordobás, M., Bernal, J., Díaz, R., Iriso, A., Sevillano, O., Escacena, C., de la Fuente, S., Arce, A., Estirado, A., Frutos, J. and Fúster, F. (2012). Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. Medidas de investigación y control medioambiental. *Profesión Veterinaria*, 17, 6-15.
- Vilhena, H., Granada, S., Oliveira, A.C., Schallig, H.D., Nachum-Biala, Y., Cardoso, L. and Baneth, G. (2014). Serological and molecular survey of *Leishmania* infection in dogs from Luanda, Angola. *Parasit Vectors*, 7, 114.

- Vitoriano-Souza, J., Moreira, N., Menezes-Souza, D., Roatt, B.M., de Oliveira Aguiar-Soares, R.D., Siqueira-Mathias, F.A., de Oliveira Cardoso, J.M., Giunchetti, R.C., de Sá, R.G., Corrêa-Oliveira, R., Carneiro, C.M. and Reis, A.B. (2013). Dogs immunized with LBSap vaccine displayed high levels of IL-12 and IL-10 cytokines and CCL4, CCL5 and CXCL8 chemokines in the dermis. *Mol Immunol*, 56, 540-548.
- Vitoriano-Souza, J., Reis, A.B., Moreira, N.D., Giunchetti, R. C., Correa-Oliveira, R. and Carneiro, C.M. (2008). Kinetics of cell migration to the dermis and hypodermis in dogs vaccinated with antigenic compounds of *Leishmania braziliensis* plus saponin. *Vaccine*, 26, 3922-3931.
- Vivero, R.J., Torres-Gutierrez, C., Bejarano, E.E., Peña, H.C., Estrada, L.G., Florez, F., Ortega, E., Aparicio, Y. and Muskus, C.E. (2015). Study on natural breeding sites of sand flies (Diptera: Phlebotominae) in areas of *Leishmania* transmission in Colombia. *Parasit Vectors*, 8, 116.
- Viñuelas, J., García-Alonso, M., Ferrando, L., Navarrete, I., Molano, I., Mirón, C., Carcelén, J., Alonso, C. and Nieto, C.G. (2001). Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Vet Parasitol*, 101, 23-27.
- Volf, P. and Myskova, J. (2007). Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol*, 23, 91-92.
- Volf, P., Hostomska, J. and Rohousova, I. (2008). Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite*, 15, 237-243.
- Vouldoukis, I., Rougier, S., Dugas, B., Pino, P., Mazier, D. and Woehrlé, F. (2006). Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol*, 135, 137-146.
- WHO (2010). Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva.
- Woerly, V., Maynard, L., Sanquer, A. and Eun, H.M. (2009). Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitol Res*, 105, 463-469.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 247, 1465-1468.
- Woodland, D.L. (2004). Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol*, 25, 98-104.
- Xavier, S.C., de Andrade, H.M., Monte, S.J., Chiarelli, I.M., Lima, W.G., Michalick, M.S. and Tafuri, W.L. (2006). Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res*, 2, 17.
- Xenoulis, P.G., Saridomichelakis, M.N., Chatzis, M.K., Kasabalis, D., Petanides, T., Suchodolski, J.S. and Steiner, J.M. (2014). Prospective evaluation of serum pancreatic lipase immunoreactivity and troponin I concentrations in *Leishmania infantum*-infected dogs treated with meglumine antimonate. *Vet Parasitol*, 203, 326-330.
- Yeagley, T.J., Reichard, M.V., Hempstead, J.E., Allen, K.E., Parsons, L.M., White, M.A., Little, S.E. and Meinkoth, J.H. (2009). Detection of *Babesia gibsoni* and the canine small *Babesia* 'Spanish isolate' in blood samples obtained from dogs confiscated from dogfighting operations. *J Am Vet Med Assoc*, 235, 535-539.

- Zatelli, A., Borgarelli, M., Santilli, R., Bonfanti, U., Nigrisoli, E., Zanatta, R., Tarducci, A. and Guarraci, A. (2003). Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *Am J Vet Res*, 64, 558-561.
- Zer, R., Yaroslavski, I., Rosen, L. and Warburg, A. (2001). Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int J Parasitol*, 31, 810-814.
- Zerpa, O., Ulrich, M., Blanco, B., Polegre, M., Avila, A., Matos, N., Mendoza, I., Pratlong, F., Ravel, C. and Convit, J. (2007). Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Br J Dermatol*, 156, 1328-1335.
- Zivicnjak, T., Martinković, F., Marinculić, A., Mrljak, V., Kucer, N., Matijatko, V., Mihaljević, Z. and Barić-Rafaj, R. (2005). A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. *Vet Parasitol*, 131, 35-43.
- Zoghalmi, Z., Chouih, E., Barhoumi, W., Dachraoui, K., Massoudi, N., Helel, K.B., Habboul, Z., Hadhri, M.H., Limam, S., Mhadhbi, M., Gharbi, M. and Zhioua, E. (2014). Interaction between canine and human visceral leishmaniases in a holoendemic focus of Central Tunisia. *Acta Trop*, 139, 32-38.

8. *ANEXOS*

8. ANEXOS

Anexo 1. Formulario clínico de seguimiento post-infección (Publicación 4.1).

Animal (Registro Interno):		Nº Microchip :				
DÍAS POST-INFECCIÓN		Día	Día	Día	Día	Día
Fecha		.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...
Temperatura rectal (°C)						
Peso (kg)						
Muestras (S:sangre; MO:médula ósea; O:orina; Hi: hisopos de conjuntiva, mucosa oral y vulva)		S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> Hi <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> Hi <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> Hi <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> Hi <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/> Hi <input type="checkbox"/>
Condición y órganos afectados	Signos clínicos	PUNTUACIÓN (rodear con un círculo el valor correcto)				
General	Apetito	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Astenia	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Poliuria/Polidipsia	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3
Músculos	Atrofia de músculos temporales	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Atrofia muscular generalizada	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
Sistema inmune	Adenopatías	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Esplenomegalia	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3
Ojos	Conjuntivitis, blefaritis, queratitis	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Uveitis	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3
Mucosas	Mucosas pálidas	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2
	Epístaxis	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3
	Lesiones orales	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
Aparato digestivo	Vómitos	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Diarrea	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
Articulaciones	Cojeras y/o dolor articular	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3
Piel	Eritema	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2
	Úlceras	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Alopecia	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Dermatitis seborréica	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Hiperqueratosis nasal	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2
	Hiperqueratosis plantar	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2
	Hiperqueratosis generalizada	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Onicogriposis	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2
PUNTUACIÓN TOTAL (/52)						

Anexo 2. Puntuaciones clínicas basada en las alteraciones clinicopatológicas de perros infectados con *L.infantum* (Publicación 4.1). (Puntuación máxima total: 16).

ALTERACIONES CLINICOPATOLÓGICAS		0	1	2
Hemograma	Hematocrito/Hemoglobina	Normal	Anemia leve	Anemia grave
	Serie blanca	Normal	Leucocitosis	Leucopenia
	Plaquetas	Normal	-	Trombocitopenia
Bioquímica	Proteínas	Normal	Aumentadas	-
	Urea	Normal	Aumentada	-
	Creatinina	Normal	Aumentada	-
	Ratio albúmina/globulinas	Normal	Disminuido	-
	ALT	Normal	Aumentada	-
Iones	Cloro	Normal	Hipocloremia	-
	Potasio	Normal	Hipopotasemia	-
	Sodio	Normal	Hiponatremia	-
Orina	Densidad	Normal	Disminuida	-
	Proteínas	Normal	100 mg/dl	> 500 mg/dl
	Ratio proteína/creatinina	Normal (< 0.5)	> 0,5 < 2	> 2

Anexo 3. Formulario clínico de seguimiento post-tratamiento con FPA (Publicación 4.2).

Animal (Registro Interno):		Nº Microchip :					
DÍAS POST-TRATAMIENTO		PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	PT6
Fecha		.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...
Temperatura rectal (°C)							
Peso (kg)							
Muestras (S:sangre; MO:médula ósea; O:orina)		S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/>
Condición y órganos afectados	Signos clínicos	PUNTUACIÓN (rodear con un círculo el valor correcto)					
General	Apetito	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Astenia	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Poliuria/Polidipsia	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3
Músculos	Atrofia de músculos temporales	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Atrofia muscular generalizada	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
Sistema inmune	Adenopatías	0 1 3	0 1 3	0 1 3	0 1 3	0 1 3	0 1 3
	Esplenomegalia	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3
Ojos	Conjuntivitis, blefaritis, queratitis	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Uveítis	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3
Mucosas	Mucosas pálidas	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2
	Epistaxis	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3
	Lesiones orales	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
Aparato digestivo	Vómitos	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Diarrea	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
Articulaciones	Cojeras y/o dolor articular	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3	0 3
Piel	Eritema	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2
	Úlceras	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Alopecia	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Dermatitis seborréica	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2	0 1 2
	Hiperqueratosis nasal	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2
	Hiperqueratosis plantar	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2
	Hiperqueratosis generalizada	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2
	Onicogriposis	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2	0 2
PUNTUACIÓN TOTAL (/52)							

Anexo 4. Puntuaciones clínicas basada en las alteraciones clínico-patológicas de perros infectados con *L.infantum* (Publicación 4.2). (Puntuación máxima total: 19).

ALTERACIONES CLÍNICOPATOLÓGICAS		0	1	2
Hemograma	Hematocrito/ Hemoglobina	Normal	Anemia leve	Anemia grave
	Serie blanca	Normal	Leucocitosis	Leucopenia
	Plaquetas	Normal	-	Trombocitopenia
Bioquímica	Proteínas	Normal	Aumentadas	-
	Urea	Normal	Aumentada	-
	Creatinina	Normal	Aumentada	-
	Ratio albúmina/ globulinas	Normal	Disminuido	-
	ALT	Normal	Aumentada	-
Iones	Cloro	Normal	Hipocloremia	-
	Potasio	Normal	Hipopotasemia	-
	Sodio	Normal	Hiponatremia	-
Orina	Densidad	Normal	Disminuida	-
	Proteínas	Normal	100 mg/dl	> 500 mg/dl
	Ratio proteína/ creatinina	Normal (< 0.5)	> 0,5 < 2	> 2

Anexo 5. Formulario de seguimiento clínico post-tratamiento con OIPC (Publicación 4.3).

Nombre del animal:		Propietario:		Caso Nº:	
Dosis de tratamiento con OIPC VO una vez al día durante 14 días (4		V2 Día 0	V3 Día 15	V4 Día 30	V5 Día 90
Tratamientos concomitantes (fármaco y posología):					
Fecha					
Temperatura rectal (°C)					
Muestras (S: Sangre; O: Orina; MO: Medula ósea)		S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/>	S <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> O <input type="checkbox"/>
Condición y órganos afectados	Signos clínicos	PUNTUACIÓN (encerrar con un círculo el valor correcto)			
Condición General	Apetito	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Depresión/Astenia	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Poliuria/Polidipsia	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Músculos	Atrofia de músculos temporales	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Atrofia muscular general	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Sistema inmune	Adenopatías	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Esplenomegalia	0 2	0 2	0 2	0 2
Ojos	Conjuntivitis y/o blefaritis	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Queratitis y/o uveítis	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Mucosas	Mucosas pálidas	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Epístaxis	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Lesiones orales (úlceras y nódulos)	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Aparato digestivo	Vómitos	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Diarrea	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Articulaciones	Artritis	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Piel	Eritema	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Úlceras	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Nódulos	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Alopecia	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Despigmentación y/o hiperpigmentación	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Dermatitis seborreica	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Hiperqueratosis nasal	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Hiperqueratosis plantar	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Hiperqueratosis generalizada	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
	Onicogriposis	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
PUNTUACIÓN TOTAL		/74	/74	/74	/74

Anexo 6. Valores de referencia del laboratorio para perros adultos.

Hemograma:

Hematíes ($\times 10^6/\mu\text{l}$): 5,5-8,5

Hematocrito (%): 37,0-55,0

Hemoglobina (g/dl): 12,0-18,0

Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$): 6,0-17,0

Fórmula leucocitaria:

- Cayados: 0-0,03 (0-3%)
- Segmentados: 3,0-11,5 (60-77%)
- Eosinófilos: 0,1-1,25 (2-10%)
- Basófilos: 0-0,1 (0-1%)
- Linfocitos: 1,0-4,8 (12-30%)
- Monocitos: 0,15-1,35 (3-10%)

Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$): 200-500

Reticulocitos: <60.000/ μl anemia no regenerativa

>60.000/ μl anemia regenerativa

Perfil hepato-renal:

Creatinina (mg/dl): 0,3-1,4

Fosfatasa alcalina total (U/l): 25-190

GPT (U/l): 10-60

Urea (mg/dl): 10-58

Iones:

Potasio (mEq/l): 3,8-5,8

Sodio (mEq/l): 140-155

Cloro (mEq/l): 105-125

Proteinograma:

Proteínas totales (gr/dl): 5,5-7,8

Albumina (gr/dl): 2,4-3,9

Ratio albumina/globulinas: 0,72-1,5

Globulinas totales (gr/dl): 2,7-4,6

- Globulina α 1 (gr/dl): 0,2-0,5 (1,1-6,3%)
- Globulina α 2 (gr/dl): 0,3-1,1 (1,2-17,6%)
- Globulina β (gr/dl): 1,3-2,7 (9,3-34,5%)
- Globulina γ (gr/dl): 0,5-1,2 (2,6-15,1%)

Urianálisis:

Sistema IRIS (International Renal Interest Society):

Ratio proteína/creatinina:

- <0,2 ausencia de proteinuria
- 0,2-0,5 DUDOSO (Mayor importancia en presencia de azotemia)
- > 0,5 presencia de proteinuria (*)

**NOTA: Descartar sedimento de orina activo (inflamación, infección, sangrado...)*

